

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**

**E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA**

**Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en alpacas  
(*Vicugna pacos*) machos reproductores del Centro  
Experimental La Raya, Cusco**

**TESIS**

**Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario**

**AUTOR**

**Frank Eloy Ayala Limaylla**

**ASESOR**

**Teresa López Urbina**

**Lima – Perú**

**2014**

## **DEDICATORIA**

*A Dios por la vida y todas  
las bendiciones que me ha dad.o*

*A mis padres por su apoyo, tolerancia y  
cariño durante toda mi vida..*

*A mis hermanos: Christian y Sarella  
por ser buenos ejemplos a seguir y estar  
pendientes de mi desarrollo profesional.*

*Al. dr. Armando Gonzalez y a la  
dra.. Teresa López por su amistad,  
apoyo incondicional en ese trabajo  
y todos los consejos.*

## **AGRADECIMIENTO**

*A toda mi familia por ser la razón  
de todos mis logros*

*Al dr. Armando y a la dra. Teresa por ser  
como padres durante esta etapa*

*Al dr. Luis Gomez por su gran amistad, consejos  
apoyo y conocimientos brindados.*

*ALourdes y Ana por el apoyo brindado  
durante el muestreo*

## INDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTO .....	iii
INDICE DE CONTENIDO .....	iv
RESUMEN: .....	v
ABSTRACT:.....	vi
LISTA DE CUADROS .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	viii
I. INTRODUCCION.....	1
II. REVISION DE LITERATURA .....	3
A. Etiología.....	3
B. Localizacion en el hospedador.....	4
C. Ciclo de vida .....	5
D. Epidemiología .....	7
E. Zoonosis.....	16
F. Prevalencia.....	17
G. Signos clínicos .....	20
H. Patogenie y lesiones .....	20
I. Diagnostico.....	22
J. Prevencion, control y tratamiento .....	24
III. MATERIALES Y METODOS.....	28
A. Lugar de estudio.....	28
B. Tamaño de muestras y animales.....	28
C. Recoleccion de muestras.....	28
D. Técnica para la tinción de los ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	29
E. Análisis de datos .....	31
IV. RESULTADOS .....	35
V. DISCUSION.....	39
VI. CONCLUSIONES .....	45
VII. RECOMENDACIONES .....	46
VIII. LITERATURA CITADA.....	47

## RESUMEN:

Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en alpacas (*Vicugna pacos*) machos reproductores del Centro Experimental La Raya, Cusco

La criptosporidiosis es una infección protozoaria de distribución mundial, ocasionada por diversas especies del Género *Cryptosporidium*, que se evidencia con cuadros de diarrea en animales jóvenes, en niños recién nacidos y humanos inmunosuprimidos. Sin embargo, su presencia también se reporta en individuos asintomáticos. El objetivo del presente trabajo fue determinar la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en alpacas machos reproductores del Centro Experimental La Raya, Cusco. El diseño del trabajo incluyó el muestreo de la totalidad de los machos reproductores del Centro Experimental La Raya (n=156). Las muestras de heces se fijaron con metanol y se colorearon con el método de Ziehl Neelsen Modificado, para detectar la presencia de *Cryptosporidium*. Los resultados fueron analizados para determinar la prevalencia. Se encontró que la prevalencia corregida de *Cryptosporidium andersoni* fue de 53.1% y la de *Cryptosporidium parvum-like* fue de 18.5%. Se concluye que *Cryptosporidium andersoni* y *Cryptosporidium parvum-like* son los agentes que parasitan a las alpacas machos reproductores y que la prevalencias encontradas de *Cryptosporidium* spp. fueron altas comparadas con otros estudios en camélidos sudamericanos

Palabras clave: *Cryptosporidium* spp, criptosporidiosis, alpacas machos reproductores, prevalencia

## **ABSTRACT:**

Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in male breeding alpacas (*Vicugna pacos*) of Experimental Center La Raya, Cusco

Cryptosporidiosis is an infection of worldwide distribution, caused by many species of the Genus *Cryptosporidium*, which is evidenced by cases of diarrhea in young animals, in human newborns and immunosuppressed. However, their presence is also reported in asymptomatic individuals. The aim of this study is to found the prevalence of *Cryptosporidium* spp. in male breeding alpacas Experimental Center La Raya, Cusco. The work includes sampling of all breeding males Experimental Center Raya (n=156). Stool samples were fixed with methanol and stained with Ziehl Nielsen modified to detect the presence of *Cryptosporidium*. The results were analyzed to determine the prevalence. We found that the prevalence of *Cryptosporidium andersoni* was 53.1% and *Cryptosporidium parvum* was 18,5%. This study concluded that *Cryptosporidium andersoni* and *Cryptosporidium parvum-like* are the agents that parasitize the male breeding alpacas and the prevalences of *Cryptosporidium* spp. were high compared with other studies in South American camelids.

Keywords: *Cryptosporidium* spp., cryptosporidiosis, alpacas, breeding males, prevalence

## LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1. Medidas de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. ....31
- Cuadro 2. Prevalencias encontradas en el presente estudio de acuerdo a la especie.....34
- Cuadro 3. Prevalencia corregida de *C. parvum-like* usando distribución beta.....35
- Cuadro 4. Prevalencia corregida de *C. andersoni* usando distribución beta.....35
- Cuadro 5. Medidas de los ooquistes de los animales positivos a la prueba de Ziehl Neelsen.....36

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Medidas de un ooquiste *C. parvum-like* .....31
- Figura 2. Medidas de un ooquiste *C. andersoni*.....31



## **I. INTRODUCCION**

El Perú posee la mayor población mundial de camélidos sudamericanos, cuya crianza representa una de las principales actividades económicas para un gran sector de su población. Se estima que la población de camélidos sudamericanos en todo el territorio nacional es de 4' 900 000 unidades, por lo que se considera una de las mayores producciones del mundo. Así mismo, la crianza de alpacas es la principal y única actividad económica del poblador alto andino del país (ONU, 2010) y la mayor parte del valor económico derivado del sector alpaquero se encuentra principalmente en la producción de fibra (FAO 2006). Adicionalmente, la carne y la elaboración de cueros y pieles de alpaca para actividades artesanales constituyen una fuente de trabajo importante (FAO 2005).

La producción de fibra de alpacas está concentrada en pequeños productores representando aproximadamente 80% de la producción nacional. El ingreso familiar de los criadores alto andinos oscila entre 490 y 900 dólares al año, provenientes de la venta o trueque de la producción de fibra y carne de alpaca (ONU, 2010). No obstante, los beneficios de la crianza de la alpaca se ven mermados por una serie de problemas sanitarios, en especial los que afectan a los recién nacidos, ya que las alpacas son susceptibles a un gran número de enfermedades, cuya importancia varía de acuerdo al sistema de crianza y al fundo alpaquero (FAO 2005). Estudios realizados por el Instituto

Veterinario de Investigación Tropical y de Altura – IVITA evidencian que el principal problema que se presenta entre las explotaciones alpaqueras es a nivel sanitario. Esto se traduce en una notable disminución de la productividad animal, a lo que se suma una pérdida valiosa de fuentes proteicas.

En los rumiantes, el riesgo de adquirir infecciones de diversas etiologías se incrementa durante el primer mes de vida. En este sentido, la diarrea es una importante causas de morbilidad y mortalidad en animales neonatales (Cebra *et al* 2003; Whitehead y Anderson 2006). El Complejo Diarreico Neonatal es la enfermedad entérica más común y costosa que afecta crías de llamas y alpacas (Cebra *et al.*, 2007; Palacios *et al.*, 2006; Rosadio y Ameghino 1994). Comprenden por orden de importancia las ocasionadas por bacterias y virus. Pero, no se debe descartar la posibilidad que los agentes parasitarios, como el *Cryptosporidium*, pudieran estar involucradas en el Complejo Diarreico Neonatal (Holland, 1990). Además, la criptosporidiosis es una enfermedad que produce diarreas tanto en humanos como en animales (Fayer *et al.*, 2010).

La patogenicidad del *Cryptosporidium* varía con las especies involucradas, la edad y el estado inmune del hospedador (Xiao *et al.*, 2004). No se conoce la especie de *Cryptosporidium* que afecta en mayor proporción a los machos reproductores, si esta puede producir diarrea en ellos, ni si afecta la producción de lana y carne. No obstante, los estudios epidemiológicos de prevalencia de la criptosporidiosis en alpacas siempre se han hecho en crías y en madres, pero no en machos reproductores. Este hecho tal vez se deba a que los machos reproductores, al igual que las madres y cualquier animal adulto con un sistema inmune intacto, puede no tener diarrea a pesar de estar eliminando ooquistes de *Cryptosporidium*. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue determinar la prevalencia de la criptosporidiosis en machos reproductores para comprender mejor la epidemiología de la enfermedad.

## II. REVISION DE LITERATURA

### A. Etiología

Los miembros del género *Cryptosporidium* están clasificados como parásitos intracelulares y protozoos eucariotas. Pertenecen al Phylum Apicomplexa, Clase Coccidea, Orden Eucoccidiorida, Familia Cryptosporidiidae y Género *Cryptosporidium*. El género *Cryptosporidium* es el único miembro de la Familia Cryptosporidiidae y es uno de los cerca de 300 géneros incluidos en el Phylum Apicomplexa (Fayer y Xiao 2007).

Las características moleculares de las especies y genotipos del *Cryptosporidium* han revolucionado el entendimiento de la diversidad biológica de este organismo (Cacciò *et al.*, 2005). Solo hasta el año 2010 ya estaba reportado que el género *Cryptosporidium* comprendía 20 especies válidas y cerca del triple de genotipos (Fayer 2010; Fayer *et al.*, 2008; Ryan *et al.*, 2008; Plutzer y Karanis 2009). Así mismo, se reporta que los miembros de este género parasitan cerca de 150 especies de mamíferos incluyendo humanos, así como aves, reptiles, anfibios y peces (Fayer y Xiao 2007).

El humano puede ser afectado por varias especies de *Cryptosporidium*. Entre las especies y genotipos que afectan a los humanos tenemos a *C. hominis*, *C. parvum* (Cacciò *et al.*, 2005), *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis*, *C. muris*, *C. andersoni*, *C. ubiquitum* y los genotipos

*caballo, zorrillo y mono*. Todos ellos han sido detectados en heces de humanos inmunocompetentes e inmunocomprometidos (Learmonth *et al.*, 2004; Leoni *et al.*, 2006; Chalmers *et al.*, 2009). Sin embargo, la mayoría de humanos suelen estar infectados por *C. hominis* y *C. parvum* (Cacciò *et al.*, 2005)

El primer estudio de la presencia de *Cryptosporidium* en camélidos sudamericanos se realizó en alpacas y llamas adultas (Rojas *et al.*, 1988). Posteriormente, se realizaron estudios moleculares con aislados de alpacas originarias del Perú, los que lograron caracterizar a *C. parvum* (Spano *et al.*, 1997; Morgan 1998b) y una secuencia única en los aislados de *C. parvum* (Stevens *et al.*, 2007). Posteriormente, Gómez-Couso *et al.*, (2012) realizó la primera caracterización molecular tanto de *C. parvum* y *C. ubiquitum* en alpacas peruanas, y el primer reporte de *C. ubiquitum* en este hospedador.

Los ooquistes del *Cryptosporidium* poseen algunas características morfológicas únicas. Son de pared gruesa y totalmente esporulados y contienen cuatro esporozoitos desnudos, sin la presencia de un esporoquiste (Fayer y Xiao 2007). Además, son pequeños, refringentes, de pared gruesa y de forma esférica u ovoide, con esporozoitos elongados y un cuerpo residual oscuro (Fayer y Xiao 2007). Sus medidas pueden variar ligeramente, por ejemplo, para *C. parvum* es de 5.41 x 4.94  $\mu\text{m}$ , para *C. ryanae* es de 3.73 x 3.16  $\mu\text{m}$  (Fayer *et al.*, 2008), para *C. ubiquitum* es de 5.19  $\mu\text{m}$  x 4.87  $\mu\text{m}$ . (Fayer *et al.*, 2010) y para *C. xiaoi* es de 3.64 x 3.4  $\mu\text{m}$  (Fayer y Santín 2009).

## **B. Localización en el hospedador**

*Cryptosporidium* infecta y se localiza de una manera peculiar en las células parasitadas. La localización específica en las células es intracelular y extracitoplasmática (Fayer y Xiao 2007), mientras que su localización en el órgano es en las microvellosidades de las células epiteliales del tracto gastrointestinal de toda clase de vertebrados, incluyendo a los humanos (Xiao *et al.*, 2004). Sin embargo, el *Cryptosporidium* ha sido encontrado en lugares extraintestinales en individuos severamente inmunocomprometidos (Fleta *et al.*, 1995).

La mayoría de especies de *Cryptosporidium* afecta el tracto gastrointestinal. Por ejemplo, el sitio primario de la infección por *C. hominis* y *C. parvum* es el intestino delgado. Más específicamente, en algunos animales como el ratón y las vacas, el íleon (por encima de la unión

cecal) es el lugar específico para *C. parvum*. Por otro lado, otras especies como *C. muris* y *C. serpentis* afectan la mucosa gástrica y *C. andersoni* la mucosa del abomaso, así como *C. baileyi* la bursa de Fabricio, el árbol respiratorio y la cloaca (Fayer y Xiao 2007).

### C. Ciclo de vida

El ciclo de vida del *Cryptosporidium* es directo, con una fase endógena y otra exógena, con cambios sólo en la endógena. Solo hay cambios en la fase endógena, la que empieza después que el ooquiste es ingerido por el hospedador. El primer paso hacia la infección, una vez dentro del cuerpo, es el desenquistamiento (apertura de la pared del ooquiste). El desenquistamiento deja libre a los esporozoitos y requiere que el ooquiste sea expuesto a condiciones reductoras en el estómago, seguido por la exposición a las enzimas pancreáticas y/o sales biliares, como sucede en la mayoría de parásitos Apicomplexa relacionados con *Cryptosporidium* (Fayer y Xiao 2007).

Los esporozoítos invaden activamente a las células hospedadoras. Estos son mótils, se acercan a la parte apical de la célula hospedadora y la invade activamente (Wetzel *et al.*, 2005). Se caracterizan por la presencia de organelas secretoras que aparecen durante la invasión (O' Hara *et al.*, 2005). Los esporozoítos de *C. parvum* expresan una compleja glicoproteína llamada CSL que contiene un ligando involucrado en la unión con las células del epitelio intestinal durante la infección (Langer y Riggs, 1999).

Conforme progresa el proceso de internalización y el parásito queda rodeado, los esporozoitos cambian de forma y pasan a llamarse trofozoítos. Inicialmente, los esporozoítos unidos a las células del hospedador son finos y en forma de *boomerang* o media luna, pero progresivamente cambian de forma y se convierten en ovals o esféricos (Fayer y Xiao, 2007). Las vacuolas cercanas al extremo anterior (que surgieron probablemente del parásito) circundan al parásito y forman una vacuola preparasitófora (Huang *et al.*, 2004). Esta área vacuolar se fusiona con la membrana de la célula del hospedador formando una interfase hospedador – parásito y las extensiones citoplasmáticas delgadas unidas a la membrana de la célula de las microvellosidades del hospedador rodean al parásito (Umehiya *et al.*, 2005).

La formación de la vacuola parasitófora en el *Cryptosporidium* permite su localización intracelular pero extracitoplasmática. En este sentido, una vez que se unen las extensiones del

parásito con las microvellosidades del hospedador queda formada una vacuola parasitófora madura (Umemiya *et al.*, 2005). En consecuencia, los esporozoítos dentro de la vacuola parasitófora son intracelulares, pero no están en contacto directo con el citoplasma de la célula del hospedador, por ello son extracitoplasmáticos.

La multiplicación asexual, llamada merogonia, resulta cuando los núcleos de los trofozoítos se dividen para formar los merontes. Los merontes que se forman son sucesivamente el Tipo I y el Tipo II. El meronte Tipo I desarrolla seis u ocho núcleos, cada uno incorporado dentro de un merozoíto. Teóricamente, cada merozoíto maduro deja el meronte para infectar otra célula del hospedador y se convierte en otro meronte. Los merozoítos del merontes Tipo I pueden dar lugar a la formación de otros merontes Tipo I o a merontes Tipo II. Mientras que los merontes Tipo II producen cuatro merozoítos que son los encargados de la reproducción sexual, con la formación de los gamontes (Fayer y Xiao, 2007)

Los merozoítos formados del meronte Tipo II infectan nuevas células del hospedador para diferenciarse en gamontes. Los gamontes se diferencian en microgamontes y macrogamontes, masculino y femenino, respectivamente. Cada microgamonte se convierte en multinucleado, y cada núcleo es incorporado en un microgametocito, mientras que los macrogamontes permanecen uninucleados, denominándose macrogametocitos. Una vez que el microgametocito entra en el citoplasma del macrogametocito pueden suceder dos eventos, o bien entra en el núcleo o bien pasa su contenido nuclear a través de la membrana nuclear del macrogametocito. Sólo los macrogametocitos fertilizados se convierten en ooquistes (Fayer y Xiao 2007).

La esporogonia es la esporulación de los ooquistes del *Cryptosporidium*, que da como resultado la formación de cuatro esporozoítos. La esporogonia se realiza *in situ* y cuando los ooquistes maduran contienen cuatro esporozoítos desnudos, sin la formación de un esporoquiste. Entonces, los ooquistes ya salen al medio ambiente totalmente infectivos, es por ello que se dice que los ooquistes no sufren cambios durante la fase exógena. Los ooquistes del tracto gastrointestinal son excretados con las heces, mientras los que están en el tracto respiratorio dejan el cuerpo con las secreciones nasales (Fayer y Xiao 2007).

## D. Epidemiología

### 1. Fuentes de contagio y vías de infección en humanos y animales

*Cryptosporidium* spp. son transmitidos principalmente por la ruta fecal-oral y necesitan de una dosis infectante para producir la enfermedad. Las oportunidades de infección de humanos aumentan con el contacto cerrado humano-humano y durante el cuidado de ganado infectado, animales de zoológico o animales de compañía (Fayer y Xiao 2007). En individuos susceptibles se ha observado que pueden ser necesarios tan sólo 10 ooquistes para inducir la enfermedad. Por otro lado, los animales infectados con *Cryptosporidium* spp. pueden excretar 300 a 1500 ooquistes por gramos de heces (Enemark *et al.*, 2002) y pueden expulsar mucho más que  $10^{10}$  ooquistes durante la infección, siendo una fuente de infección significativa para otros animales (Tzipori y Ward, 2002).

Las fuentes potenciales de infección por *Cryptosporidium* spp. pueden ser muy diversas. En este sentido, los ooquistes pueden estar presentes en ríos, arroyos, embalses, en agua potable, en aguas residuales tratadas o no, así como en ambientes donde se concentra un gran número de ooquistes y una gran cantidad de animales susceptibles (Díaz, 2002). Numerosos brotes de criptosporidiosis debido a comida o agua (potable o recreacional) contaminada han sido reportados en muchas naciones industrializadas, donde se identificó al agua como la mayor ruta de transmisión en áreas donde la enfermedad era endémica (Weinstein *et al.*, 1993).

La presencia de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en el medio ambiente es muy frecuente, de allí que muchos animales domésticos puedan contaminarse. Los ooquistes son capaces de desarrollarse en numerosas especies de mamíferos, por ello es un hecho que el medio ambiente puede quedar contaminado con ooquistes producidos por animales de granjas con criptosporidiosis clínica, ya que estos son capaces de eliminar una gran cantidad de ooquistes. Además, los humanos y una amplia variedad de animales pueden adquirir la infección a través de varias formas, por la presencia ubicua de los ooquistes en el medio ambiente (Clark, 1999). No obstante, al parecer el agua es el principal medio de transporte de ooquistes de *Cryptosporidium* originados por animales de granja (Budu-Amoako *et al.*, 2011).

Hay estudios que correlacionan directamente el incremento del número de ooquistes en la superficie del agua con el incremento de la densidad del ganado doméstico (Budu-Amoako *et al.*, 2011). La alta prevalencia de ooquistes de *C. andersoni* en aguas superficiales y en aguas residuales

indican que los rumiantes son probablemente la mayor fuente de contaminación de *Cryptosporidium* (Jellison, *et al.*, 2002). Efectivamente, un estudio concluyó que las cuencas pobladas con una gran cantidad de animales de uso agrícola presentaban un incremento de la concentración de ooquistes de *Cryptosporidium*, comparada con las cuencas menos pobladas (Omg *et al.*, 1996; Ono *et al.*, 2001).

El medio ambiente, incluyendo el mar, puede quedar contaminado con ooquistes de *Cryptosporidium* spp., si se tiene en cuenta que estos son eliminados en grandes cantidades. Por ello, la contaminación del mar está estrechamente relacionada con la presencia de sitios de descarga de aguas residuales. Un ejemplo de ello son las descargas de aguas provenientes de granjas de animales domésticos, donde se espera que los niveles de contaminación sean altos. Aunque, esta contaminación también puede estar asociada con la presencia de ciertos animales silvestres, como aves marinas que frecuentan áreas donde hay moluscos (Slifko *et al.*, 2000).

La estación del año influye en el cambio de la distribución de casos de criptosporidiosis. El cambio difiere con el tiempo, ya que está relacionado al periodo de lluvias (Naumova *et al.*, 2005). Los brotes de la enfermedad que tienen por origen el agua potable y que han sido asociados con fuertes lluvias e inundaciones, conforman cerca del 8 % de los casos de criptosporidiosis (Yamamoto *et al.*, 2000). En consecuencia, esta situación refleja la contaminación de las fuentes de agua con aguas residuales y desechos animales en épocas de lluvia (Fayer y Xiao 2007).

*Cryptosporidium* ha sido considerado, a nivel mundial, como un patógeno de referencia que indica calidad de agua. La OMS ha clasificado su presencia como indicadora de calidad de agua debido a su ubicuidad relativa y la resistencia del ooquiste en agua y en el medio ambiente (King y Monis 2007). Además, se ha tenido en consideración el acceso limitado que se tiene al tratamiento o vacunación en humanos y otros animales y el impacto socioeconómico de la criptosporidiosis, particularmente en poblaciones humanas, en donde el SIDA/VIH es prevalente (Medema *et al.*, 2006).

Las enfermedades transmitidas por alimentos son muy comunes, pero no hay estimaciones precisas de los casos que existen. La información de los brotes reportados representan sólo una pequeña proporción de los casos reales de enfermedades transmitidas por alimentos, debido a que muchos brotes no son reconocidos o no son reportados (Budu-Amoako *et al.*, 2011). La vigilancia



relacionada a los brotes por consumo de alimentos contaminados, particularmente por protozoos, no está debidamente desarrollada en muchas ciudades (Slifko *et al.*, 2000).

Los parásitos comúnmente no son considerados como fuente de infección cuando se evalúa una enfermedad. Generalmente los parásitos no son tomados en cuenta cuando se evalúa una enfermedad, sobre todo cuando los síntomas de la enfermedad que producen son similares a los de infecciones bacterianas (Recourt *et al.*, 2003). En el caso particular de la criptosporidiosis, se tiene información que el estimado es que por cada 3 casos de criptosporidiosis que son registrados, 10 000 casos permanecen sin detectar y sin registrar en la población (Horman *et al.*, 2004).

La contaminación de alimentos con *Cryptosporidium* puede ocurrir en varias fases de la cadena productiva. Se estima que esta contaminación podría ocurrir de varias formas durante el proceso de la granja a la mesa. Algunas posibles fuentes de contaminación incluyen una contaminación por los trabajadores de la granja o manipuladores y por el uso de agua contaminada con ooquistes para la irrigación de cultivos. Además, el ganado es considerado como una fuente potencial importante de contaminación de alimentos (Dixon, 2009).

## 2. Factores epidemiológicos dependientes del parásito

### a. Relacionado al ciclo biológico

*Cryptosporidium* posee la característica peculiar de poseer dos tipos de ooquistes, los de pared gruesa y los de pared delgada. Los de pared gruesa presentan doble pared y luego de la esporulación pasan inalterados a través del intestino y son eliminados con las heces. Los de pared delgada están rodeados solamente por una membrana, por lo que pueden liberar esporozoítos cuando aún están dentro del intestino e infectar nuevas células, produciéndose la autoinfección interna. Aproximadamente el 80 % de los ooquistes producidos presentan doble pared y cerca del 20% de los ooquistes producidos presentan una membrana simple (Current *et al.*, 1986), por lo que la ingestión de sólo unos cuantos ooquistes puede reproducir la enfermedad.

### b. Resistencia de los ooquistes

La naturaleza de la pared del ooquiste de *Cryptosporidium* le permite mantener su viabilidad, inclusive bajo condiciones medioambientales adversas. Los ooquistes esporulados tienen

una pared trilaminar dura que rodea y mantiene la viabilidad de los esporozoítos, los que finalmente serán la fuente de infección (Fayer y Xiao 2007). Los ooquistes pueden permanecer viables en el suelo o en el agua durante semanas o meses, dependiendo de las condiciones ambientales. Además, son resistentes a la mayoría de los desinfectantes, incluyendo el cloro en las concentraciones usadas en la purificación del agua (Fayer *et al.*, 1997).

Los ooquistes de *Cryptosporidium* son capaces de resistir temperaturas extremas por periodos largos de tiempo. En este sentido, *C. parvum* permanece infeccioso durante 6 meses en una temperatura de 5 a 15 °C (Fayer *et al.*, 1998) y resiste congelamiento durante periodos largos a temperaturas por encima de – 20 °C, pero no sobrevivieron a – 70 °C o menos, incluso en presencia de crioprotectores (Fayer y Nerad, 1996). El tiempo de supervivencia disminuye cuando la temperatura está por debajo de 5 °C o aumenta por encima de 15°C (King *et al.*, 2005). Temperaturas por encima de 64.2 °C durante 5 minutos y 72.4 °C durante 1 minuto producen ooquistes no infecciosos (Fayer, 1994).

La supervivencia y viabilidad de los ooquistes dependen de factores energéticos. Por ejemplo, la pérdida de infectividad que sufren los ooquistes después de estar sometidos a altas temperaturas está asociado con la disminución de ATP producida por una actividad metabólica elevada (King *et al.*, 2005). La longevidad de los ooquistes de *C. parvum* a temperaturas tan variadas parece estar relacionada a las reservas energéticas de carbohidratos almacenadas en los esporozoítos. Por otro lado, los gránulos de amilopectina que posee el cuerpo residual se consumen más rápidamente en relación con las altas temperaturas (Fayer *et al.*, 1998; Jenkins *et al.*, 2003).

#### c. Rango de hospedadores

El rango de hospedadores del *Cryptosporidium* involucra aves, reptiles, anfibios y peces, así como mamíferos, incluyendo humanos. Sólo en mamíferos, los miembros del género *Cryptosporidium* parasitan cerca de 150 especies. El hecho de que algunos tipos hayan sido encontrados en animales en particular y sólo en algunos países, no implica necesariamente que estos tipos estén restringidos al área en particular. Es probable que haya una adaptación substancial por tipos a especies particulares y el espectro de infectividad, por rango de hospedadores, puede variar entre cepas de infección (Fayer y Xiao 2007).

### 3. Factores dependientes del hospedador

#### a. Edad

Los diversos estudios realizados en criptosporidiosis sugieren que la enfermedad es dependiente de la edad del hospedador. Los estudios de criptosporidiosis del ganado han demostrado que la enfermedad guarda relación con la edad (Santín *et al.*, 2004; Fayer 2006, 2007). Además, la prevalencia de *Cryptosporidium parvum* varía por grupo etario y los animales recién nacidos son los más susceptibles, según se pudo observar en alpacas (López *et al.*, 2009). El hecho que la prevalencia de *Cryptosporidium* disminuya cuando aumenta la edad, es una tendencia general observada alrededor del mundo (Santín *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2010).

El ganado es susceptible a cuatro especies de *Cryptosporidium* y se ha determinado que la presentación de cada una de ellas guarda relación con la edad. En este sentido, *C. parvum* sólo es detectado en terneros sin destetar, mientras que *C. bovis* es la especie predominante en terneros de 2-6 meses (Starkey *et al.*, 2006). Por su parte, los ooquistes de *C. andersoni* no son detectados en heces de terneros lecheros dentro de las cuatro primeras semanas de vida, sino recién hasta la quinta (Kvác *et al.*, 2006). La infección por *C. parvum* constituye el 85 % de las infecciones de *Cryptosporidium* en terneros sin destetar, pero solo el 1 % de las infecciones en terneros ya destetados. Por el contrario, *C. andersoni* ha sido encontrado solo en 1% de animales sin destetar y en el ganado ya destetado en un 13 % (Santín *et al.*, 2004).

### 4. Inmunidad

El sistema inmune, tanto humoral como celular, interviene en el desarrollo de la criptosporidiosis. Las evidencias sugieren que aunque la respuesta de anticuerpos es una parte integral de la respuesta inmune de la infección por *Cryptosporidium*, la respuesta celular es más importante en la eliminación de la infección (Fayer y Xiao 2007). La infección conduce a una respuesta inflamatoria intestinal que involucra linfocitos y células fagocitarias (Tzipori, 1988). Esta respuesta ocasiona un incremento significativo de subconjuntos de células T en la mucosa (Abrahamsen *et al.*, 1997),

Las lesiones intestinales que se observan en la criptosporidiosis están asociadas al incremento de linfocitos en la mucosa. El incremento de las diferentes poblaciones de células T

genera una atrofia de vellosidades e hiperplasia de las criptas (McDonal y Spencer, 1992). Adicionalmente, se produce una expresión incrementada de citoquinas proinflamatorias inducidas células T intestinales, que están asociadas con la patología intestinal (White *et al.*, 2000; Lacroix *et al.*, 2001).

El suministro oportuno de un volumen suficiente de un calostro de alta calidad proporciona a los terneros recién nacidos una protección inicial contra muchos patógenos. Usualmente, los becerros se infectan con *Cryptosporidium* al inicio del periodo neonatal, donde se ha evaluado la capacidad de las inmunoglobulinas específicas vía calostro materno para proporcionar protección contra la infección (Fayer *et al.*, 1989). Mediante la administración de calostro se puede proveer de inmunidad pasiva (O' Handley *et al.*, 2003) y de inmunidad local en el lumen del intestino (Martín-Gómez *et al.*, 2005) para controlar las infecciones por *Cryptosporidium*. Un estudio realizado en varias localidades de Perú demostró que Ayacucho tenía la menor prevalencia de *Cryptosporidium* porque los granjeros del lugar enfatizaban el consumo de calostro en las crías (López *et al.*, 2009).

Las madres multíparas usualmente producen calostro con títulos más elevados de anticuerpos contra organismos infecciosos en comparación con el calostro de madres primíparas (Starkey *et al.*, 2007). Sin embargo, la administración temprana de calostro bovino hiper-inmune en bovinos prepara al animal contra *C. parvum* y disminuye significativamente el periodo patente, el de excreción de ooquistes y tiempo de duración de las diarrea en becerros neonatos desafiados con ooquistes comparados a los animales controles que recibieron calostro normal (Fayer *et al.*, 1989).

#### 5. Factores medioambientales

Existen factores de riesgo que están asociados a la presentación de la criptosporidiosis clínica. Cuando las crías no ingieren el calostro, cuando existe una pobre higiene en la explotación y la presencia de otros enteropatógenos, son factores relacionados a la presentación de la enfermedad clínica. Por ello, el riesgo de criptosporidiosis es mayor en establos hacinados, probablemente debido a condiciones de manejo e higiene deficientes (Alonso-Fresán *et al.*, 2005).

##### a. Tamaño de los rebaños

Los estudios epidemiológicos de la criptosporidiosis han demostrado que el tamaño de los rebaños influye en la presentación de la enfermedad. En este sentido, un rebaño numeroso contaría con mayor número de becerros, que son particularmente susceptibles a la infección (Mohammed *et*

al., 1999). Los estudios de Starkey *et al.* (2006) demostraron que los rebaños con gran densidad tuvieron altas prevalencia de ooquistes compatibles con *C. parvum*, comparadas con rebaños de poca densidad ubicados en la misma área estudiada. Asimismo, la probabilidad de expulsión de ooquistes *C. parvum* se incrementó con el número de terneros no destetados en el hato.

El tamaño de los rebaños puede predisponer la presentación de la enfermedad. Los rebaños relativamente grandes llegan a tener más de 100 crías con sus respectivas madres en un mismo corral. En consecuencia, el hacinamiento y estrés de los animales pueden favorecer la presentación de la enfermedad (De Graaf *et al.*, 1999). Adicionalmente, las instalaciones y pastizales permanecerían ocupadas por más tiempo, lo que favorece la acumulación continua de ooquistes e incrementa la contaminación del ambiente (Mohammed *et al.*, 1999). La mayoría de criadores de alpacas y veterinarios recomiendan que la densidad de población debe ser de no más de 5 a 10 crías por acre, aunque la densidad máxima de la población para alpacas en Estados Unidos no ha sido establecida (Starkey *et al.*, 2007).

#### b. Prácticas de manejo (higiénico- sanitario)

Algunos sistemas de manejo pueden favorecer el riesgo de contraer la criptosporidiosis. Los sistemas de manejo que favorecen el contacto entre becerros están asociados con el riesgo de infección, ya que se incrementaría la probabilidad de la transmisión del parásito entre animales infectados y susceptibles (Mohammed *et al.*, 1999). De esta manera, la probabilidad aumenta en las explotaciones ganaderas que cuentan con instalaciones de maternidad colectivas para el alojamiento de vacas (Garber *et al.*, 1994). También se debe tomar como factor de riesgo el número de otras especies de animales en la explotación pecuaria (Mohammed *et al.*, 1999).

La eliminación de una gran cantidad de ooquistes de *Cryptosporidium* contribuye a la contaminación de las instalaciones y del medio ambiente. Algunos autores plantearon que la exposición inicial ocurre en los potreros de parición, como consecuencia de la eliminación fecal de ooquistes por las vacas pre-parto y en el periodo de parición (Faubert y Litvinsky, 2000). Los ooquistes eliminados por las madres contaminan las ubres, la cama, bebederos y alimento (Garber *et al.*, 1994). Además, los ooquistes se excretan esporulados, por lo que resulta difícil liberar el ambiente de dichas formas infectivas (Díaz 2002). Por lo tanto, el lavado de las instalaciones parece ser el método más efectivo para controlar la contaminación por *C. parvum* (Garber *et al.*, 1994).

El control de la criptosporidiosis se debe implementar mediante buenas prácticas de manejo. Entre ellas están el uso de iodo en la desinfección del cordón umbilical al nacimiento y la toma de calostro inmediatamente después del nacimiento (López et al., 2009). En consecuencia, para prevenir la criptosporidiosis se recomienda la rotación adecuada de áreas de ternera (Garber et al., 1994; Trotz-Williams et al., 2007) y tomar medidas adecuadas de higiene, que ayudarían a reducir la carga ambiental de este y otros patógenos, los cuales pueden exacerbar la enfermedad clínica (Díaz 2002).

#### c. Estacionalidad

Entre los factores considerados de riesgo para la presentación de brotes de criptosporidiosis se encuentra la estacionalidad. Algunos estudios encontraron que la enfermedad se observa particularmente durante la primavera (Lake et al., 2005). Por su lado, los estudios realizados en Nueva York y otras regiones, con condiciones climáticas similares, indicaron que la estación del año que representaba el mayor riesgo para contraer la infección era el invierno (Hamnes et al., 2006; Huctink et al., 2001). Sin embargo, otros autores reportan que existe un incremento de la prevalencia durante el verano (Garber et al., 1994; Trotz-Williams et al., 2007).

La contaminación del ambiente con patógenos se produce especialmente en algunas épocas del año. Existe una asociación entre los brotes de criptosporidiosis y la temporada de lluvias torrenciales e inundaciones (Bridgman et al., 1995). También, hay un aumento de la contaminación de las fuentes de agua por *Cryptosporidium* y *Giardia* spp (Kisternam et al., 2002). En este sentido, la concentración de ooquistes en muestras de aguas de río es más alta cuando las muestras se toman después de la temporada de lluvias, comparada con las que se toman en otros periodos (Hansen y Ongerth, 1991). Por ello, las aguas residuales y desechos animales encontrados en las aguas empleadas como fuentes de agua potable reflejan la contaminación (Li et al., 2005)

La estacionalidad y la presentación de los brotes de criptosporidiosis se deben analizar tomando en cuenta otros factores inherentes a la crianza. En este sentido, la estacionalidad por si sola puede ser un factor de riesgo, pero que no está sujeta a intervención. Por ello, la determinación de la presencia de variación estacional es de importancia porque el patrón observado podría estar asociado con la modificación de prácticas de manejo según la estación (Szonyi et al., 2010).

#### d. Pasturas y nutrición

La nutrición y la disponibilidad de pastizales de buena calidad durante la temporada de parición aparentemente influyen en la presentación de la criptosporidiosis. En este sentido, López *et al.* (2009) encontraron altos rangos de prevalencia de *Cryptosporidium* en crías de alpacas menores de 15 días de edad, en regiones con baja disponibilidad de zonas de pastoreo, como los departamentos de Huancavelica y Puno. En contraste, Ayacucho, la región con más alta disponibilidad de zonas de pastoreo presentó la menor prevalencia.

#### e. Estrés

El estrés en los animales reduce la proliferación de linfocitos B y T y ejerce efectos adversos sobre el funcionamiento del sistema inmune. El estrés acelera el desarrollo y crecimiento de tumores, retrasa la producción de anticuerpos y suprime la actividad de las células asesinas naturales, linfocitos T citotóxicos y macrófagos ante la exposición del organismo a un agente infeccioso. La hormona adrenocorticotrofa ACTH producida por la hipófisis tiene como órgano blanco las glándulas suprarrenales que en respuesta al estímulo secretan glucocorticoides como el cortisol y catecolaminas como la adrenalina (Gómez-González *et al.*, 2002).

El cortisol y las catecolaminas ejercen funciones inmunomoduladoras. De esta manera, contribuyen a regular el funcionamiento del tercer efector de la respuesta al estrés, el sistema inmunológico (Selye 1936). Estos influyen directamente sobre el funcionamiento de las células inmunes al acoplarse a sus receptores específicos, localizados en el citoplasma y membrana celular, y también ejercen efectos indirectos al alterar la producción de citocinas como el interferón gamma, el factor de necrosis tumoral y las IL-1, IL-2 e IL-6, todas necesarias para la maduración y movilización de los linfocitos y otras células inmunitarias (Glaser *et al.*, 2005).

Durante la exposición del organismo al estrés ocurre hipofuncionamiento del sistema inmune y este queda vulnerable. El organismo queda expuesto a la acción de los agentes infecciosos del ambiente, es más susceptible a padecer enfermedades e incluso puede sucumbir (Selye 1950). En este sentido, las alpacas machos compiten mediante exhibiciones agresivas para tener un mayor rango en el grupo, territorio y acceso a aparearse. Jarman y Jarman (1974) mostraron que los camélidos adultos machos determinan el rango por medio de presentaciones agresivas con peleas

ocasionales. El rango es importante ya que solo los machos con más rango compiten por los territorios y por aparearse.

### **E. Zoonosis**

No todas las especies de *Cryptosporidium* tienen la habilidad para infectar a los humanos. Las especies *C. hominis* y *C. parvum* son las que mayormente infectan al humano (Cacciò *et al.*, 2005) y la evidencia sugiere que las fuentes de infección son predominantemente heces humanas y de animales de campo (generalmente vacunos y ovejas) (Fayer y Xiao, 2007). No obstante, los últimos estudios de epidemiología molecular indican que *C. meleagridis* es el responsable de más infecciones humanas de las que se pensaba. Por ejemplo, las tasas de infección con *C. meleagridis* son más altas que las de *C. parvum* en países como Perú (Cama *et al.*, 2008 Xiao, 2010), lo que indicaría que la expansión de *C. meleagridis* es un problema de salud pública (Xiao *et al.*, 2004).

Las especies de *Cryptosporidium* pueden tener un rango amplio de hospedadores, por lo que existe la probabilidad que puedan emerger como nuevos patógenos en humanos. Por ejemplo, *C. andersoni* y *C. bovis*, consideradas especies exclusivas del ganado bovino, han sido reportadas como responsables de algunas infecciones en humanos. Por lo tanto, *C. andersoni* (Kvác *et al.*, 2004; Morse *et al.*, 2007) y *C. bovis* pueden causar infecciones zoonóticas bajo ciertas circunstancias (Khan *et al.*, 2010), sobre todo cuando los cambios ambientales y socioeconómicos favorecen la transmisión (Xiao *et al.*, 2004).

Las infecciones zoonóticas por contacto directo con animales de granja están siendo reportados en áreas rurales. El primer caso de criptosporidiosis atribuido a la alpaca se reportó cuando una persona quedó infectada por el contacto con una cría que estaba eliminando ooquistes sin presentar diarrea (Starkey *et al.*, 2007). Por otro lado, en Irán se encontraron humanos padeciendo de criptosporidiosis que estaban en contacto directo con los camellos (Sazmand *et al.*, 2012). Sin embargo, la importancia relativa de la infección zoonótica directa de criptosporidiosis no está enteramente clara. (Mirón *et al.*, 2001). Es probable que el número de especies identificadas causantes de enfermedad en animales se incremente y junto con esto, la enfermedad en humanos (Fayer y Xiao 2007).



## F. Prevalencia

Los numerosos estudios de prevalencia de *C. parvum* reportan que existe una amplia variación en terneros lecheros. En Noruega se encontró un 12% (Hamnses *et al.*, 2006), en Australia y Zambia un 40 % y 50 %, respectivamente (Becher *et al.*, 2004; Geurden *et al.*, 2006), 79 % en India (Singh *et al.*, 2006) y 100% en Israel (Tanriverdi *et al.*, 2006). Pero, los estudios que aplicaron muestreos repetitivos usualmente reportaron altos periodos de prevalencia mayores a 90% (Uga *et al.*, 2000) y 100% (Castro-Hernida *et al.*, 2002b). Por otro lado, la prevalencia en Henan-China fue de 21.5% en terneros no destetados y las especies predominantes fueron de *C. bovis* (37.8%) y *C. parvum* (31.4 %) (Wang, *et al.*, 2011a).

En el continente americano también existe una amplia variación de la prevalencia de *C. parvum* en terneros lecheros. En Estados Unidos se reportó que el 22% de terneros de 1103 explotaciones lecheras excretaron ooquistes de *C. parvum* (Garber *et al.*, 1994) y en Canadá se encontró el 63 % en terneros sin destetar (Mann *et al.*, 1986) y el 40.6 % en terneros de leche de 7 a 21 días (Trotz-William *et al.*, (2005). Mientras que en México y Brasil se observaron prevalencias de 25% y 27,8%, respectivamente (Garcia y Lima, 1993; Maldonado *et al.*, 1998) y en Venezuela el 18 % en bovinos de 2 a 12 semanas de edad y el 4% en animales de entre 13 y 20 semanas (Surumay y Alfaro, 1999).

Los estudios de epidemiología molecular han ayudado a esclarecer la distribución de la enfermedad. Los estudios que emplearon análisis moleculares revelaron que en terneros destetados mayores de 2 meses no se encontró *C. parvum*, pero si las especies *C. bovis* y *C. ryanae* (Szonyi *et al.*, 2010). Estos descubrimientos concuerdan con otros reportes, aunque no se deben ignorar los hallazgos hechos por algunos estudios, los cuales encontraron ooquistes de *C. parvum* en ganado adulto (Fayer *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2006; Santín *et al.*, 2004).

La distribución de *Cryptosporidium* varía según los estudios realizados en Asia, América y Europa. *C. andersoni* parecer ser la especie dominante en terneros lecheros destetados (3-11 meses) y vaquillas en China. (Wang *et al.*, 2011b). La prevalencia de *Cryptosporidium* en Heilongjiang en China fue de 5.3 % en adultos y terneros destetados, mientras que la especie predominante fue *C. andersoni* con un 96.2 % de las muestras positivas (Liu *et al.*, 2009). En contraste, en Estados Unidos la especie predominante en terneros ya destetados fue *C. bovis*. Una distribución similar se encontró en países europeos como Dinamarca y Estonia (Santín *et al.*, 2008).

La prevalencia de criptosporidiosis en terneros lecheros varía según la edad de los animales, el tipo de crianza y la especie de *Cryptosporidium* involucrada. Por ejemplo, en establos lecheros de la Republica Checa la prevalencia en terneros no destetados fue de 27.1% para *C. parvum* y 0.9 % *C. andersoni*. En contraste, la prevalencia en terneros ya destetados fue de 33 % para *C. andersoni* y 0% para *C. parvum*. Además, este trabajo concluyó que los terneros que estaban en pastizales todo el año tenían menor probabilidad de infección a *C. andersoni* que los terneros mantenidos en un establo durante el invierno (Kvác *et al.*, 2006).

La prevalencia de la criptosporidiosis en animales adultos puede ser muy variada. En China, la prevalencia en vacas lecheras va desde 0% a 75.4 %, dependiendo de las áreas geográficas de estudio y los métodos usados para la detección (Liu *et al.*, 2009). Adicionalmente, un estudio realizado en vacas lecheras encontró una prevalencia de 55% (Budu-Amoako *et al.*, 2012), mientras que varios trabajos han reportado prevalencias hasta de 100% (Starkey *et al.*, 2006). Del mismo modo, estudios realizados en Venezuela encontraron una prevalencia de 57 % fue en vacas adultas, donde se halló dos valores morfológicas, que sugieren la presencia de *C. parvum* y *C. andersoni* (Díaz *et al.*, 2002).

La distribución de las especies de *Cryptosporidium* varía según la edad de los animales. Los animales sin destetar (5-60 días) están infectados predominantemente por *C. parvum* (85%) y en menor proporción por *C. bovis* (9%) y *C. andersoni* (1%). En terneros ya destetados (3-11 meses) el 26% de animales son positivos con predominio de *C. bovis* (55%) y en menor proporción por *C. ryanae* (31%), *C. andersoni* (13%) y *C. parvum* (1%) (Santín *et al.*, 2004). Por otro lado, en vaquillas (1-2 años) la prevalencia es de 12% con predominio de *C. andersoni* (44%) y en menor proporción por *C. bovis* (35%) y *C. parvum* (6%) (Fayer *et al.*, 2006). Finalmente, en vacas lecheras (3 años a mas) prevalece el *C. andersoni* (65%) y en menor proporción *C. bovis* (29%) y *C. parvum* (6 %). (Fayer *et al.*, 2007)

La prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en ovejas y cabras, al igual que en otros rumiantes, puede ser muy variable. En ovejas y cabras se han encontrado prevalencias en un rango que va desde 4.8% a 77.4%, dependiendo del lugar y la técnica usada para el diagnóstico. (Fayer y Santín 2009). En China, un estudio de criptosporidiosis realizado en ovejas encontró una prevalencia baja de 14.6% (Shen *et al.*, 2011). De igual manera, en España se encontró una prevalencia baja, de 7.8% en ovejas, pero una prevalencia mucho mayor, de 59% en corderos (Causape *et al.*, 2002). En

Brasil, un estudio en cabras lecheras encontró un porcentaje de 4.8 % (Bomfim *et al.*, 2005). En todos los estudios se demostró que la presentación de *Cryptosporidium* está relacionada con diarrea en animales jóvenes.

En alpacas se han realizado estudios epidemiológicos de la criptosporidiosis en los países de origen, pero también fuera de Sudamérica. Una prevalencia de 8.8 % fue reportada en Inglaterra y en Gales, en muestras de crías de alpaca y de llama (Twomey *et al.*, 2008). Adicionalmente, en Estados Unidos, en crías de llamas de 1-2 semanas y crías de alpaca de 1-14 semanas, se observaron prevalencias de 6.7 % y 25.9 %, respectivamente (Cebra *et al.*, 2003; Whitehead y Anderson, 2006). Asimismo, un estudio realizado en granjas de Nueva York y Pensilvania encontró prevalencias de *C. parvum* de 8% en madres de 3- 19 años y de 7 % en crías de 1-3 meses (Burton *et al.*, 2012).

Los estudios de criptosporidiosis en alpacas determinaron que la prevalencia es relativamente baja. La prevalencia de *C. parvum* en alpacas crías de 1 a 15 días de edad en varias localidades de la sierra del Perú se determinó entre 10 a 26 % (López *et al.*, 2009). Mientras que la prevalencia de *C. parvum* en alpacas neonatales con y sin diarrea fue de 10-15% y 6%, respectivamente (García, 1995). Además, se detectó que las alpacas con presencia de *C. parvum* tienen 2,36 veces más probabilidad de sufrir diarrea que las crías sanas (López, 1997). Recientemente, los estudios de epidemiología molecular han determinado una prevalencia de 4.4 % en crías de alpaca (Gomez-Couso *et al.*, 2012).

La prevalencia de *Cryptosporidium* en personas puede variar dependiendo de si presentan síntomas o no. En personas asintomáticas la prevalencia puede ser del 0.99%, comparado con el 2.91 % en pacientes con síntomas. El rango de portadores asintomáticos puede ser alto en países en vías de desarrollo con condiciones sanitarias deficientes, como Bolivia, donde se encontró que 31.6 % de personas portaban el organismo (Esteban *et al.*, 1998). Asimismo, el porcentaje de casos humanos en Inglaterra y Gales causados por *C. parvum* y *C. hominis* es aproximadamente igual (47%). En cambio, *C. meleagridis* produjo menos del 1%, y otros genotipos sólo el 3.6 % (Alves *et al.*, 2006)

## **G. Signos clínicos**

El periodo prepatente y el patente de la criptosporidiosis varían según la edad del hospedador. El periodo prepatente es el tiempo desde la ingestión de los ooquistes hasta que los primeros aparecen en las heces ingeridos. Este tiempo varía con la edad del hospedador y las especies de *Cryptosporidium*, así como la dosis infectiva. El *C. parvum* en terneros tiene un rango de 2 a 7 días, pero puede ser mayor conforme aumenta la edad del hospedador. El periodo patente son los días de excreción de los ooquistes. Los rangos de los periodos patentes experimentalmente determinados para *C. parvum* son de 1 a 12 días, dependiendo de la edad del hospedador, pues se acorta conforme aumente la edad de este (Fayer y Xiao 2007).

La criptosporidiosis en alpacas se presenta del mismo modo que en otros rumiantes. El *C. parvum* es uno de los principales enteropatógenos asociados a la alta morbilidad y baja mortalidad en alpacas neonatales (Rojas, 2004). La enfermedad cursa con depresión, anorexia, deshidratación, dolor abdominal, fiebre y notoriamente con diarrea (López *et al.*, 2001). Al examen físico de las crías se puede encontrar hipertermia, taquicardia, taquipnea y signos de deshidratación como ojos hundidos, membranas mucosas secas y signos de shock hemodinámico. Además, los exámenes serológicos pueden demostrar hiponatremia, hipocloremia, hipocalemia, azotemia e hipoalbuminemia (Waite *et al.*, 2008).

La severidad y duración de la criptosporidiosis depende en gran medida del estado inmune de la persona o animal infectado. Los individuos inmunocompetentes pueden sufrir una enfermedad aguda leve, moderada o severa, mientras que los individuos inmunocomprometidos pueden sufrir una enfermedad crónica severa e incluso la muerte (Fayer y Xiao, 2007). En humanos los síntomas van desde una diarrea aguda, o una diarrea severa crónica, hasta infecciones asintomáticas (Priest *et al.*, 2005). En niños inmunocompetentes con criptosporidiosis el 30% presenta diarrea (Bern *et al.*, 2002). Pero, en pacientes con VIH+ hay una gran diversidad de síntomas, ya que la enfermedad está relacionada al estatus inmune (Flanigan *et al.*, 1992).

## **H. Patogenie y lesiones**

El ataque del *Cryptosporidium* al epitelio intestinal desencadena una serie de alteraciones estructurales. Los esporozoítos, que son mediados por un receptor-ligando (Smith *et al.*, 2005), desencadenan un reordenamiento de la actina del citoesqueleto de la célula hospedadora, para

formar la vacuola parasitófora y ejercer su efecto en las células de alrededor (Cheng y LaRuso, 2000). En efecto, la infección de la línea celular ileocecal con *Cryptosporidium* condujo a la sobreexpresión de muchos genes del hospedador para actina y tubulina y la baja regulación de genes para proteínas de anclaje de la actina, confirmando su rol en la modificación de la estructura del citoesqueleto del hospedador (Deng *et al.*, 2004).

La criptosporidiosis reduce la absorción intestinal, aumenta la secreción y disminuye la digestión en animales afectados. Debido a la pérdida de epitelio, atrofia de vellosidades e hiperplasia de la cripta se reduce la absorción intestinal normal, lo que conduce a una deshidratación y un desbalance electrolítico. Parte de la diversa sintomatología observada en animales con criptosporidiosis es debida a la malabsorción secundaria de las vellosidades, las cuales están inflamadas o dañadas con una secreción de fluidos de las criptas igual o aumentada (GoodGame *et al.*, 1995). La mala digestión se debe a la pérdida de las enzimas digestivas unidas a la membrana del enterocito, lo cual conlleva a pérdida de peso y emaciación en animales neonatales (Whitehead y Anderson 2006).

El ataque de *Cryptosporidium* a las células epiteliales activa el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFkB) el cual induce varios mecanismos. Por ejemplo, son inducidos los mecanismos antiapoptóticos, así como la sobreexpresión pro inflamatoria de las expresiones de las citoquinas /quimioquinas (Cheng *et al.*, 2001). Las citoquinas producidas por las células afectadas por *Cryptosporidium* son principalmente el TNF y el gamma Interferón. El TNF estimula la secreción de cloruro a través del mediador de prostaglandina, favoreciendo la presentación de diarrea (Clark y Sears, 1997), mientras que el gamma Interferón ha sido implicado en el desarrollo de un epitelio disfuncional y defectuoso mediante su efecto en el intercambio de iones sodio/hidrogeno y bombas de sodio-potasio-ATPasa dependiente (Rocha *et al.*, 2001; Sugi *et al.*, 2001).

En vacas se reporta que el *Cryptosporidium andersoni* infecta el abomaso del ganado juvenil y maduro y que no produce signos clínicos aparentes. Sin embargo, esta especie ha sido implicada como una causa de la reducción de producción de leche (Santín *et al.*, 2004; Fayer *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2007). A nivel histológico, los estadios del ciclo de vida de *C. andersoni* se encuentran solo en la mucosa del epitelio de la plica, en la curvatura mayor y menor y cerca del

ostium omasoabomasal. Pero, en la necropsia no se detectan cambios macroscópicos en la mucosa del abomaso (Kvác *et al.*, 2008).

## **I. Diagnostico**

Para el diagnóstico de la enfermedad se pueden emplear numerosas técnicas con el objetivo de buscar formas de desarrollo u ooquistes de *Cryptosporidium*. El diagnóstico de la infección en humanos y animales se puede realizar mediante técnicas histológicas para el examen ultraestructural del material de biopsia y buscar los diferentes estadios de desarrollo del parásito en el borde ciliado del enterocito, así como la infiltración celular característica. Además, se puede realizar el examen de heces para determinar la presencia de ooquistes o la detección de antígenos o del ADN de *Cryptosporidium* (Fayer y Xiao 2007).

Los métodos de concentración de ooquistes por flotación o sedimentación son utilizados para mejorar los métodos de diagnóstico de *Cryptosporidium*. La concentración mediante flotación puede utilizar soluciones como la de sucrosa (o de Sheather) (Enemark *et al.*, 2002), la de sulfato de zinc (Wade *et al.*, 2002), la de sulfato de magnesio, la de nitrato de magnesio, o la de cloruro de sodio (Pavlásek 1995). Los métodos de concentración mediante la sedimentación utilizan éter (Pena *et al.*, 1007), cloruro de cesio (Fayer *et al.*, 2000) y formol-aldehído (Mtambo *et al.*, 1997).

Los métodos de concentración pueden ser eficaces para el diagnóstico de *Cryptosporidium*, pero pueden tener efectos indeseables. El método más eficaz para concentrar ooquistes es el que utiliza la solución de Sheather o la solución de sulfato de magnesio. Por el contrario, se debe tener en cuenta que las soluciones de flotación salina (Kvác *et al.*, 2002) y la de sucrosa (Robertson *et al.*, 1993) pueden producir la distorsión del ooquiste. Adicionalmente, los métodos de sedimentación muestran un alto porcentaje de debrís que impide una lectura eficaz y rápida (Kvac *et al.*, 2002).

Cuando se emplean los métodos de flotación se pueden observar varios fenómenos que dificultan el diagnóstico. Un fenómeno observado es el de la cristalización de la muestra en la lámina. Este disminuye el tiempo disponible para realizar el examen, ya que después de la cristalización es imposible examinar las muestras. Las soluciones de ZnSO<sub>4</sub>, de MgSO<sub>4</sub>, de NaNO<sub>3</sub> y de NaCl empiezan a cristalizarse dentro de los 5 minutos en las láminas. Sin embargo, la solución

de Sheather hace posible el examen de la lámina, incluso varias horas después de la flotación (Kvac *et al.*, 2002)

Los métodos de tinción usualmente reflejan las preferencias del operador antes que las diferencias en sensibilidad y especificidad. Los métodos más utilizados son los de Auramina-Fenol, Ziehl Neelsen (Enemark *et al.*, 2002), fucsina carbón o permanganato de potasio (Fayer y Xiao 2007) y Giemsa (Pavlásek, 1995). El método de Ziehl Neelsen Modificado no tiene diferencia con el de Auramina-Fenol (Mtambo *et al.*, 1992) y es sólo 5.5% menos sensible que el de inmunofluorescencia (Quilez *et al.*, 1996). Además, Kvác *et al.*, (2002) compararon varios métodos de tinción para *Cryptosporidium* y concluyeron que Ziehl Neelsen es el método de tinción más adecuado para su identificación.

Los métodos convencionales para la identificación de ooquistes de *Cryptosporidium* incluyen el examen de frotis de heces con tinciones ácido-rápidas. Entre estas se destaca la de Ziehl Neelsen Modificado, la que a pesar de consumir mucho tiempo y necesitar de una persona experimentada para una correcta identificación, (Kehl *et al.*, 1995) es usada comúnmente por poseer una sensibilidad de 83.7 % y una especificidad de 98.9 % (Morgan *et al.*, 1998a). Estudios previos demostraron que esta tinción no es significativamente menos sensible que los métodos basados en la detección inmunológica y que su costo es relativamente económico (Kehl *et al.*, 1995).

Las pruebas moleculares para el diagnóstico de *Cryptosporidium* son mucho más sensibles y específicas que la tinción de Ziehl Neelsen Modificado. La tinción de Ziehl Neelsen es menos sensible y específica que el análisis de PCR, la cual posee 100% de sensibilidad y especificidad (Morgan *et al.*, 1998a). Sin embargo, el análisis empleando la tinción de Ziehl Neelsen Modificado resulta más barato que la prueba de PCR, aunque el costo del PCR disminuye grandemente cuando hay un gran número de muestras analizadas (Kehl *et al.*, 1995).

Las características morfológicas, como tamaño y refringencia pueden ser de utilidad para distinguir ooquistes de otros objetos microscópicos. Las especies *C. muris* y *C. andersoni*, cuya ubicación es el estómago o el abomaso, respectivamente, poseen ooquistes más grandes que otras especies. Por lo tanto, el tamaño resulta útil para diferenciar especies gástricas de especies que afectan el intestino (Fayer Xiao, 2007).

Los estudios de epidemiología molecular han ayudado a esclarecer la identificación de las especies de *Cryptosporidium*, así como su distribución geográfica y el rango de hospedadores. La información de secuencia de genes se ha convertido en el factor más extensamente aplicado para definir nuevas especies. Las técnicas moleculares como PCR y los métodos inmunológicos como ELISA (Fayer y Xiao 2007) y la inmunofluorescencia indirecta (Castro-Hernida *et al.*, 2002a) son herramientas empleadas para la identificación de especies. Muchos fluidos y tejidos pueden ser usados para el análisis, incluido muestras de heces, bilis, secreciones mucoides y tejidos.

La información genética del *Cryptosporidium* se ha basado en diferencias ligeras en la secuencia de pares de bases dentro del gen, referidos a la subunidad ribosomal (ssr) 18s del ARN. La identificación de los subgenotipos refleja diferencias dentro de un genotipo basado en la información obtenida de la secuencia de genes GP60. Estos métodos son muy sensibles y las diferencias encontradas ayudan a distinguir las fuentes del parásito y el rango de hospedadores (Fayer y Xiao 2007). Sin embargo, estos métodos son muy caros y poco adecuados para el análisis de un gran número de muestras, si no se tiene el conocimiento previo del estatus parasitario (Kvác *et al.*, 2002).

## **J. Prevención, control y tratamiento**

Los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. han evolucionado para dispersarse ampliamente y para sobrevivir en ambientes para largos periodos de tiempo. Esta característica les confiere una resistencia considerable contra el efecto de la mayoría de los desinfectantes comerciales. Además, las concentraciones que tienen los desinfectantes, por lo general no son prácticas para la desinfección fuera del laboratorio (Fayer y Xiao, 2007).

A pesar que se haya probado una amplia variedad de compuestos con algunos resultados alentadores, el tratamiento de la criptosporidiosis, tanto en animales como en humanos, aún no es totalmente eficaz. Del mismo modo, los intentos para desarrollar una vacuna contra la criptosporidiosis sólo han tenido éxito parcial (Jenkins, 2004; Smith y Corcoran, 2004).

La resistencia del *Cryptosporidium* frente a los desinfectantes convencionales es una de las causas de su persistencia en el medio ambiente. De hecho, la naturaleza robusta del ooquiste, su



resistencia a los desinfectantes convencionales, la habilidad para pasar a través procesos físicos de tratamiento de agua y dosis infecciosa baja contribuye a la persistencia de este parásito en el medio ambiente (Carey *et al.*, 2004). No obstante, dos desinfectantes comerciales, formaldehído y peróxido de hidrógeno han demostrado tener una actividad anticriptosporidial parcial. Tal vez esta actividad parcial se deba a que los componentes minoritarios adicionales pueden tener algún rol en la inactivación del ooquiste (Castro-Hermida *et al.*, 2006).

Los compuestos antimicrobianos han demostrado tener cierta efectividad contra los ooquistes de *Cryptosporidium*. El lactato de halofuginona detiene la diarrea y la expulsión de ooquistes en pacientes con criptosporidiosis. Los ooquistes no se detectan en las heces después de cinco a seis días de iniciado el tratamiento. Pero, cuando se suspende el tratamiento, los ooquistes aparecen de nuevo a los siete a diez días. Este proceso indicaría que esta droga no interrumpe el ciclo biológico pero si previene la reinfección del intestino por esporozoítos o merozoítos reciclados de la primera generación (Villacrota *et al.*, 1991).

Algunos antimicrobianos actúan sobre el proceso de desenquistamiento de los ooquistes de *Cryptosporidium*, por lo tanto, se considera que tienen cierta eficacia contra el parásito. El Alfa-ciclodextrina tiene un cierto grado de eficacia profiláctica anticriptosporidial ya que las pruebas *in vitro* y las infecciones experimentales demostraron que el producto se combina con algunos componentes de la pared celular del ooquiste, alterando o dificultando el proceso de desenquistamiento y en consecuencia la liberación de esporozoítos infectivos (Castro Herninda *et al.*, 2004).

Los anticuerpos maternos tienen cierta habilidad para dar protección contra *C. parvum*. La eficacia del calostro de vacas fue evaluada administrándolo a terneros que eliminaban ooquistes y tenían diarrea por varios días. Sin embargo, ninguno de los terneros fue protegido completamente contra la infección (Fayer *et al.*, 1989). La incapacidad de protección total de los anticuerpos maternos se debe a que *C. parvum* es un parásito intracelular, que invade y lleva a cabo su ciclo biológico dentro de las líneas de células epiteliales del intestino (Chen *et al.*, 1993, Wyatt *et al.*, 1997).

Desde la década de los 90 se ha buscado una solución de protección contra el parásito mediante el sistema inmune. Los parásitos intracelulares quedan protegidos contra los efectos de los

anticuerpos, por lo que la protección contra *C. parvum* requiere la inducción de una respuesta inmune mediada por células (Chen *et al.*, 1993, Wyatt *et al.*, 1997). Basados en este principio se desarrolló una vacuna oral, la que fue exitosa protegiendo al animal neonato contra un reto experimental con *C. parvum*. Sin embargo, la vacuna falló cuando fue probada en campo, en una explotación lechera donde la infección por *C. parvum* era endémica (Harp *et al.*, 1998).

Otro tipo de anticuerpos que han demostrado cierta eficacia para neutralizar ooquistes de *C. parvum* son las inmunoglobulinas Y. El efecto de los anticuerpos específicos de yema de huevo (Ig Y) fue evaluado contra la proteína P23 (glucoproteína inmunodominante de superficie expresada en la fase temprana de la infección) de *C. parvum*. Se concluyó el uso de Ig Y de la yema contra la proteína recombinante P23 puede ser un candidato adecuado para la inmunización pasiva contra la criptosporidiosis en humanos y animales, por ser fácil de producir y barato (Shahbazi *et al.*, 2009).

Los probióticos son considerados como una nueva y prometedora alternativa para el tratamiento de *Cryptosporidium* spp. Estos son microorganismos no-patógenos viables que tienen un efecto en la prevención y tratamiento de condiciones patológicas. Los mecanismos generales de acción del probiótico incluye la competencia de receptores en la superficie intestinal, estimulación del sistema inmune, excreción de sustancia antimicrobial y la competencia con patógenos por nutrientes intraluminales (Duggan *et al.*, 2002; Rolfe, 2000). Los probióticos *L. acidophilus*, *L. reuteri* y *B. longum* producen factores que son perjudiciales para los ooquistes de *Cryptosporidium*, y se supone que los productos antimicrobiales pueden afectar al parásito. Sin embargo, esta hipótesis carece de estudios tanto *in vivo* como *in vitro* (Foster *et al.*, 2003).

La aplicación de control biológico contra *Cryptosporidium* spp. ha sido reportado en varios trabajos de investigación. Los efectos potenciales benéficos en reducir el número de ooquistes que entra en la superficie del agua han sido asociadas con tiras de vegetación de amortiguamiento (Atwill *et al.*, 2002) humedales artificiales (Betancourt y Rose, 2005) y estanques (Araki *et al.*, 2001). Además, los protozoarios predadores y los rotíferos, que ocupan nichos en aguas de mar, ríos, lagos y estanques, han sido encontrados que ingieren ooquistes de *C. parvum* bajo condiciones experimentales (Fayer *et al.* 2000b; Stott *et al.*, 2003).

El manejo y limpieza de los establos para erradicar la presencia de *Cryptosporidium* es una medida de control importante. El uso de rotación de dormideros junto a una menor carga animal por

pastizal dentro de las prácticas del manejo, pudieron constituir una medida importante para el control y prevención de la enfermedad (Bustinza, 2001). La exposición del parásito a amonio acuoso o gaseoso y peróxido de hidrógeno reduce tremendamente o eliminan la infectividad de los ooquistes, sugiriendo su aplicabilidad. Ozono parece ser uno de los más efectivos desinfectantes químicos y tiene aplicación contra ooquistes en agua (Fayer y Xiao 2007). Adicionalmente, un claro entendimiento de la epidemiología de este parásito podría ser esencial para el desarrollo estrategias de control y prevención porque la efectividad de los tratamientos con drogas o vacunas contra cryptosporidiosis no ha sido desarrollado (Shen *et al.*, 2011).

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **A. Lugar de estudio**

El estudio se realizó en el Centro Experimental de Camélidos La Raya, que se encuentra localizado a 15° latitud Sur y 70° longitud Oeste en el departamento de Cusco, a una altura de 3600 – 4200 msnm. Presenta dos periodos estacionales marcados, uno seco (Abril a Noviembre) y otro de lluvia (Diciembre a Marzo)

#### **B. Tamaño de muestras y animales**

Se muestreó la totalidad de alpacas reproductores machos de raza Huacaya del Centro Experimental La Raya – Cuzco en los meses de Febrero y Marzo del 2012 y las muestras de heces se analizaron mediante la coloración de Ziehl Neelsen Modificado, para determinar la presencia de *Cryptosporidium* spp.

#### **C. Recoleccion de muestras**

Se recolectó una muestra fecal (aprox. 3 – 6 gr) de cada macho reproductor directamente del recto en bolsas de plástico rotuladas. Se hizo una extensión de cada muestra sobre 2 láminas

portaobjetos rotuladas (con un lápiz de vidrio) con el código de la muestra, una para procesar y otra de resguardo. Se fijó con metanol absoluto durante 5 minutos en un vaso Coplin y luego se dejó secar al ambiente. Las láminas fueron trasladadas, para su procesamiento, al Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

#### **D. Técnica para la tinción de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp.**

##### *1. Reactivos*

###### a. Fucsina básica fenicada

La fucsina básica (Merck) se pesó y se procedió a su preparación. Para ello se pesaron 8 gramos y disolvieron en 345 ml de agua destilada caliente. Luego se agregó 30 ml de fenol puro y se homogenizó. A esta solución se le añadió 40 ml de alcohol de 70° y se homogenizó. Esta preparación se filtró antes de su uso y se evaluó utilizándola en la tinción de ZNM de una lámina positiva fijada con metanol.

###### b. Verde malaquita

El colorante verde malaquita (Sigma) se pesó (5g) y se disolvió en 100 ml de agua destilada fría. Esta solución fue filtrada antes de su uso y evaluada coloreando con ZNM una lámina positiva fijada con metanol.

###### c. Ácido sulfúrico al 2%

Se diluyó 2 ml de ácido sulfúrico (Sigma) en 98 ml de alcohol al agua destilada.

## 2. Tinción de Ziehl Neelsen modificada

Se utilizó la técnica de Tinción de Ziehl Neelsen modificada (Henriksen y Pohlenz, 1981), la cual consta de los siguientes pasos

:

- a) El frotis de la muestra fijada con metanol se cubrió con fucsina básica fenicada durante 20 minutos.
- b) Luego se lavó con agua corriente hasta eliminar el exceso de fucsina.
- c) Se decoloró con ácido sulfúrico al 2% durante 20 segundos.
- d) Se lavó nuevamente con agua destilada.
- e) El frotis se contrastó con verde malaquita 5% durante 5 minutos.
- f) Después de un último lavado con agua corriente fue secado.
- g) Posteriormente se agregó una gota de aceite de inmersión, se cubrió con un cubreobjetos y se examinó al microscopio con los objetivos de 40X y 100X.

## 3. Lectura de la lámina y criterios para el diagnóstico

La lectura microscópica de todas las láminas se realizó con un aumento de 400X. Un aumento de 1000X (lente de inmersión) fue usado para confirmar las muestras positivas.

Como la capa central de la pared del parásito (que se piensa es una glicoproteína /lipoproteína) le da cierta rigidez y es responsable de la propiedad de coloración ácido-rápido (Fayer y Xiao 2007) y los ooquistes contienen 4 esporozoítos desnudos (sin esporoquiste), presentan un cuerpo residual oscuro y los esporozoítos presentan una marcada refringencia (Kvác *et al.*, 2002), las muestras fueron consideradas positivas ante la presencia de organismos esféricos u ovalados de color fucsia que contrastan con un fondo teñido de verde (ooquistes de *Cryptosporidium*).

La clasificación de los ooquistes se hizo determinando el tamaño de los ooquistes (Fayer *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2004), para lo cual se utilizó un microscopio Leica DM500 y el programa de medición de la cámara microscópica Leica ICC50. Todos los ooquistes encontrados en las muestras positivas fueron medidos, tanto el ancho como el largo para poder determinar su especie (Figuras 1 y 2)

Aunque los ooquistes de varios *Cryptosporidium* spp. son morfológicamente similares, las medidas morfométricas de los ooquistes pueden tener un papel importante en la diferenciación de

algunos *Cryptosporidium* spp. (Xiao *et al.*, 2004).). Por ello, cuando se usan los métodos tradicionales de diagnóstico, como el microscopio, es más exacto referirse a las especies *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* y *C. ubiquitum* como especies “*C. parvum*-like” (especies semejantes a *C. parvum*) (Fayer 2004; Santín *et al.*, 2004; Silverias *et al.*, 2009; Starkey *et al.*, 2005). Las medidas en micras se las especies mencionadas se encuentra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Medidas de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp.

Especies de <i>Cryptosporidium</i>	Dimensiones de los ooquistes (µm)
<i>C. andersoni</i>	6.0 - 8.1 x 5.0 – 6.5
<i>C. ubiquitum</i>	4.71 – 5.32 x 4.33 – 4.98
<i>C. parvum</i>	5.5 X >4.5

## E. Análisis de datos

### 1. Prevalencia

Determinado el número de muestras positivas, se calcula la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. del Centro Experimental La Raya, Cusco, bajo la siguiente formula (Thrusfield, 1990).

### 2. Formula:

$$P = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de muestras positivas}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de muestras}} \times 100$$

El análisis de las prevalencias consideró calcular los intervalos de confianza del 95% empleando una simulación Beta desarrollada con el paquete comercial @Risk (Palisade Corp.) implementado en una planilla electrónica Excel ® (Microsoft Corp). En breve, se calculó la

prevalencia empleando una distribución beta con el número de diagnósticos positivos y negativos para los parámetros  $\alpha$  y  $\beta$  de la distribución beta, donde:

$$\begin{cases} \alpha = \text{número de éxitos} + 1 \\ \beta = \text{número de fracasos} + 1 \end{cases}$$

La simulación se corrió con 30,000 iteraciones para calcular los intervalos de confianza del 95%. Las prevalencias calculadas se corrigieron empleando la fórmula de prevalencia corregida (Ahlbom, 1990).

$$P = \frac{p + \text{Especificidad} - 1}{\text{Sensibilidad} + \text{Especificidad} - 1}$$

Donde P es la prevalencia corregida y p es la prevalencia calculada con una Sensibilidad de 83.7% y una Especificidad de 98.9%. La prevalencia corregida fue expresada con intervalos de confianza del 95% (Morgan et al., 1998a).



Figura 1. Medidas de un ooquiste *C. parvum-like*

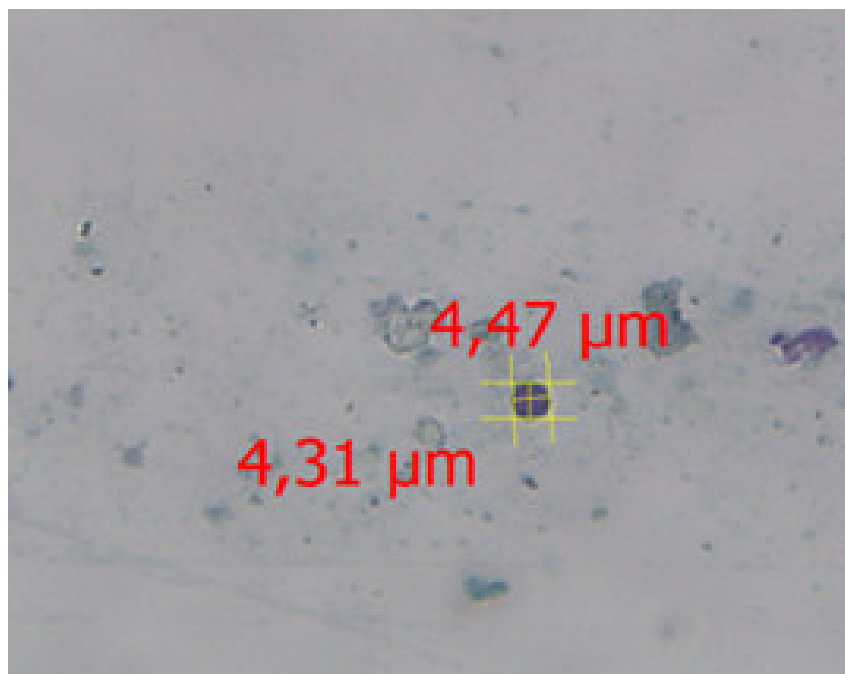
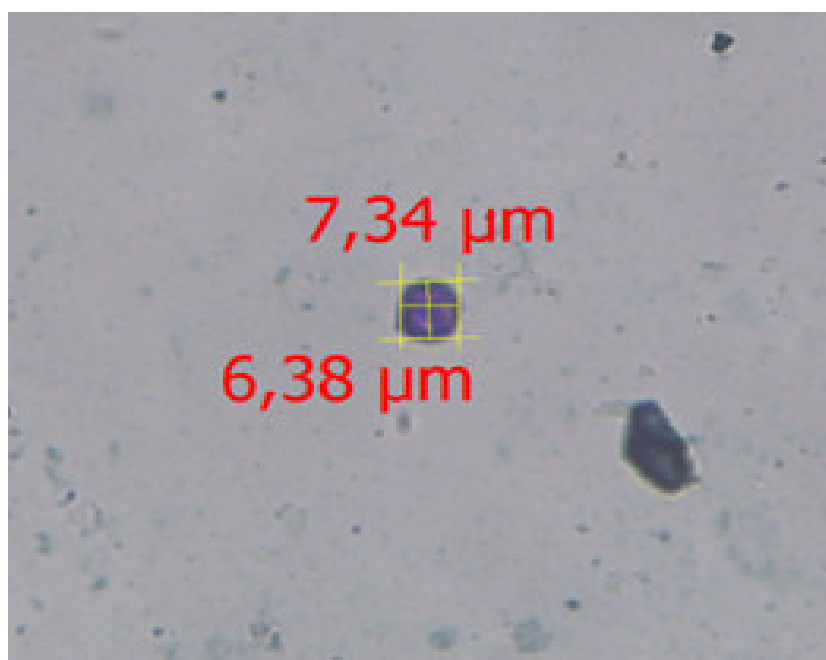


Figura 2. Medidas de un ooquiste *C. andersoni*





#### IV. RESULTADOS

De la población muestreada (156) y analizada con la Tinción de Ziehl Neelsen modificada, resultaron positivas a *Cryptosporidium* 76 alpacas machos reproductores con una prevalencia corregida de 57.6%. De las 156 animales analizados, 71 alpacas machos reproductores resultaron positivas a *C. andersoni*, con una prevalencia corregida de 53.1 % y, 27 alpacas machos reproductores a *C. parvum*-like, con una prevalencia corregida de 18.5 %. Los resultados se resumen en el cuadro 2.

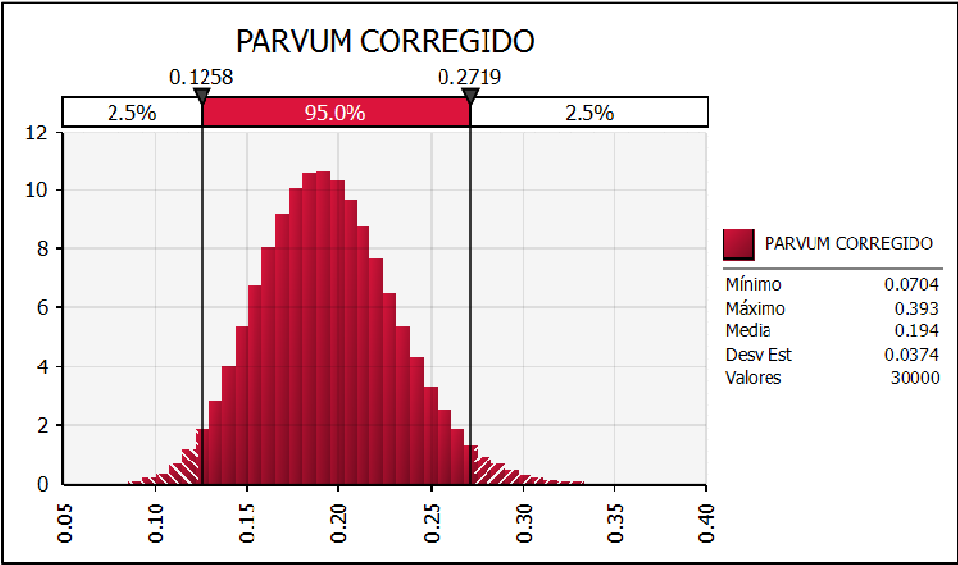
Cuadro 2. Prevalencias encontradas en el presente estudio de acuerdo a la especie.

<b>Especie de <i>Cryptosporidium</i></b>	<b>Numero de muestras (n)</b>	<b>Prevalencia (p)</b>	<b>Prevalencia Corregida (P)</b>
<i>Cryptosporidium</i> spp.	76/156	48.7%	57.6%
<i>C. andersoni</i>	71/156	45.5%	53.1%
<i>C. parvum like</i>	27/156	17.3%	18.5%

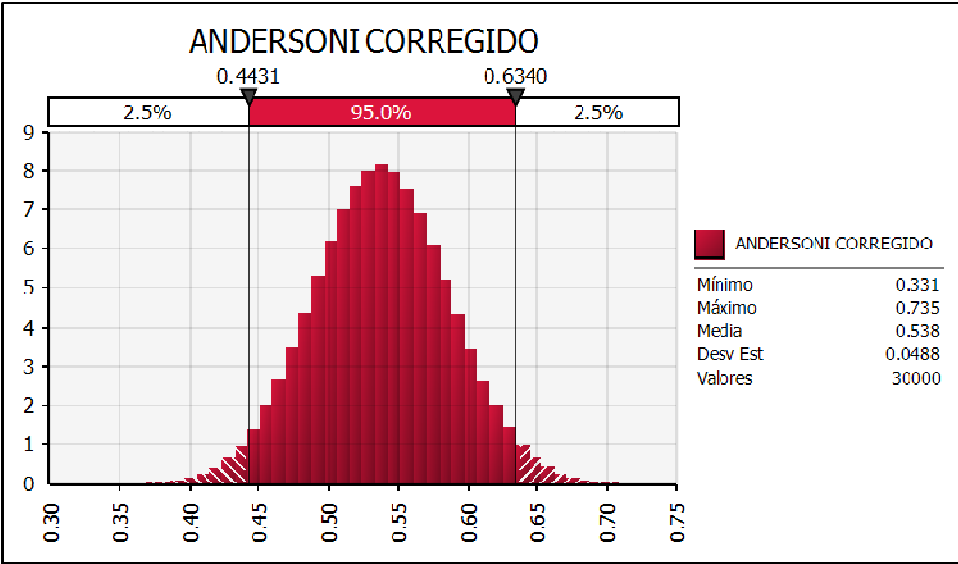
Al evaluarse la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en alpacas machos reproductores empleando una simulación Beta desarrollada con el paquete comercial @Risk (Palisade Corp.) implementado en una planilla electrónica Excel ® (Microsoft Corp) se determinó que en caso de presentarse la cryptosporidiosis se presentaría realmente con una prevalencia estocástica mínima de 12% y máxima de 27% para *C. parvum-like* (Cuadro 3). Por otro lado para *C. andersoni*

se presentaría una prevalencia estocástica mínima de 44% y máxima de 63% con intervalo de confianza de 95%. (Cuadro 4)

Cuadro 3. Prevalencia corregida de *C. parvum-like* usando distribución beta



Cuadro 4. Prevalencia corregida de *C. andersoni* usando distribución beta



La clasificación de *Cryptosporidium* mediante el tamaño de los ooquistes encontrados (Fayer *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2004) fueron compatibles con *C. andersoni* y *C. parvum*-like. Las medidas de los ooquistes de las muestras positivas estan en el cuadro 5

Cuadro 5. Medidas de los ooquistes de los animales positivos a la prueba de Ziehl Neelsen..

N# Asignado	<i>C. parvum like</i> (5.5 X >4.5)	<i>C. andersoni</i> (6.0-8.1 x 5.0 - 6.5) (Fayer y Xiao 2007)
749		8.1 x 5.8 / 7.0 x 6.2 / 7.7 x 6.3 /
751		6.1 x 5.5
757	5.1 x 4.6	
758	5.5 x 5.5	6.1 x 5.5 / 7.1 x 6.5 / 6.5 x 5.8 / 6.8 x 5.1 /
759		6.0 x 5.6 / 6.3 x 5.8
760	4.9 x 4.6	7.2 x 6.5 / 7.2 x 5.7
761	5.4 x 4.4	6.7 x 5.6
762	5.5 x 5.0 / 5.1 x 5.1	6.0 x 5.3 / 6.0 x 5.5 / 6.3 x 5.9
763		6.7 x 5.4 / 5.7 x 5.3
764		7.5 x 5.6 / 5.8 x 5.8
765		6.3 x 5.7 /
767	4.8 x 4.3	7.2 x 6.5 / 7.0 x 6.5 / 6.9 x 6.8
770	5.4 x 4.8 / 5.5 x 4.9	
773	4.9 x 4.5 / 5.5 x 5.4	
774	5.3 x 4.6 / 5.4 x 4.5 / 5.5 x 4.0	6.8 x 6.5 / 6.6 x 6.2
775	5.5 x 5.2 / 5.1 x 5.1 / 5.0 x 4.1	6.4 x 5.0 / 7.1 x 6.0 / 7.5 x 6.4 / 7.4 x 6.5
777		6.0 x 5.2
778	4.9 x 4.3	6.0 x 5.4
784	4.8 x 4.5	
785		6.0 x 5.1
786	5.0 x 4.7	6.7 x 5.9 / 6.0 x 5.8 / 8.1 x 6.0
787	5.4 x 5.0	7.0 x 6.2
790	5.5 x 5.1	6.7 x 5.6 / 7.1 x 5.9
793	4.5 x 4.0	6.5 x 6.4
794		6.0 x 5.0 / 7.3 x 6.5
795		7.4 x 6.1 / 6.2 x 6.0
796	5.1 x 4.6	7.2 x 6.7 / 6.4 x 5.6 / 7.5 x 7.3 / 6.1 x 5.5 / 8.1 x 6.4
798		6.7 x 6.4 / 7.2 x 6.9
799	4.3 x 4.2	6.8 x 6.5 / 8.1 x 6.9 / 7.4 x 6.8
800		7.7 x 6.5
802		7.2 x 6.1
807		7.6 x 6.5 / 7.5 x 6.5 / 7.6 x 6.8 / 6.5 x 6.0
810		5.5 x 6.4 / 7.8 x 6.5
811		8.1 x 6.5
812		7.2 x 5.9
814	4.6 x 4.1	6.5 x 5.0 / 6.7 x 5.5
815		7.4 x 6.3
816		7.3 x 6.5

Nº Asignado	<i>C. parvum like</i> (5.5 X>4.5)	<i>C. andersoni</i> (6.0-8.1 x 5.0 - 6.5) (Fayer y Xiao 2007)
817	5.3 x 4.7	7.2 x 6.4
822	4.4 x 4.3	6.7 x 6.2 / 6.6 x 6.3 / 6.0 x 5.0 / 7.3 x 6.3 / 6.7 x 6.4 / 7.3 x 6.5
824		7.9 x 6.5
825	5.2 x 4.9	7.4 x 6.2
827	5.2 x 5.1 / 5.1 x 5.0	6.8 x 6.1 / 7.3 x 6.3 / 7.8 x 6.1
828		7.5 x 6.4
829	5.1 x 4.9	7.8 x 6.5 / 7.3 x 5.6
831		8.1 x 6.5
832		7.8 x 6.5 / 7.5 x 6.5 / 7.1 x 6.0 / 7.8 x 6.4 / 5.7 x 5.7 / 5.9 x 5.4
833		8.1 x 6.3 / 7.6 x 6.3 /
835		7.1 x 7.0 / 7.5 x 7.1
836		7.1 x 6.4 / 7.0 x 6.5 / 6.8 x 5.4 / 7.6 x 6.2 / 7.3 x 5.4 / 7.8 x 6.5 / 7.5 x 5.9
840		7.2 x 5.9
841		8.0 x 6.3
844		7.5 x 6.2 / 6.5 x 5.9
845		8.0 x 5.5
850		8.1 x 6.5 / 7.0 x 6.5
851		8.1 x 6.1
853		7.5 x 5.9 / 7.6 x 6.4
854		7.7 x 6.3
855		7.7 x 6.5 / 7.3 x 6.3 /
856		8.1 x 6.5
857		7.9 x 6.5 / 7.3 x 6.4 / 7.5 x 5.9
858		8.0 x 5.5 / 7.0 x 6.4
861		7.2 x 6.5 / 5.5 x 6.0 / 7.3 x 6.9
862		8.1 x 6.4
863	5.3 x 5.0	7.9 x 6.0
870		7.9 x 6.4
871		8.0 x 6.2 / 8.1 x 6.3
874	5.5 x 5.3 / 5.5 x 5.0	7.7 x 6.5 / 6.7 x 6.3 / 6.8 x 5.1 / 7.1 x 6.3 / 7.5 x 6.3 / 7.3 x 6.4
875		7.5 x 6.2 / 7.0 x 6.3 / 7.1 x 5.9
878		7.0 x 5.9 / 7.0 x 6.0
880		7.1 x 6.7 / 6.3 x 6.2 / 6.7 x 5.1 / 7.0 x 6.3
881		6.3 x 6.2 / 7.0 x 6.3
882		7.3 x 6.5 / 7.0 x 6.3
884	5.5 x 4.9	7.0 x 6.2 / 6.3 x 5.0 / 6.7 x 6.1 / 5.8 x 6.2
886		7.2 x 6.2
898		7.6 x 6.3 / 8.0 x 6.5

## V. DISCUSION

La evaluación de los ooquistes para este trabajo se realizó mediante análisis microscópico de los frotis fecales teñidos con Ziehl Neelsen modificado. Este método de rutina es el más comúnmente usado para detectar muestras de heces con *Cryptosporidium* en veterinaria, por ser más económico que Inmunofluorescencia indirecta o PCR (Kehl *et al.*, 1995) y por poseer una sensibilidad de 83.7 % y una especificidad de 98.9 % (Morgan *et al.*, 1998). Estudios previos demostraron que esta tinción no es significativamente menos sensible que los métodos basados en la detección inmunológica y que su costo es relativamente accesible (Kehl *et al.*, 1995).

En el presente estudio, el 56% (76/156) de la población de alpacas machos muestreada resultaron positivas a *Cryptosporidium* spp. Aunque los ooquistes de varias especies de *Cryptosporidium* fueron morfológicamente similares, las medidas morfométricas de los ooquistes pueden tener un rol importante en la diferenciación de algunos *Cryptosporidium* spp. (Xiao *et al.*, 2004). Por lo tanto, en este trabajo se midieron los ooquistes usando del programa de medición Leica ICC50 encontrando dos tamaños marcadamente distintos.

Cuando los métodos tradicionales de diagnóstico como el microscopio son usados es más exacto referirse a *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* y *C. ubiquitum* como especies “*C. parvum*-like”,

los cuales son capaces de parasitar al ganado (Fayer 2004; Santín 2004; Silverias *et al.*, 2009; Starkey *et al.*, 2005). Adicionalmente, solo *C. andersoni* puede ser identificado con certeza en heces mediante análisis microscopio, basado en el gran tamaño de sus ooquistes. (Fayer y Xiao 2007). En consecuencia, en este trabajo 71 alpacas machos reproductores resultaron positivas a *C. andersoni*, obteniendo una prevalencia corregida de 53.1 % y a *C. parvum*-like 27 alpacas machos reproductores con una prevalencia corregida de 18.5 %.

La criptosporidiosis en alpacas tiene estudios moleculares limitados en nuestro país y solo se conocen 2 especies capaces de parasitar alpacas, *C. parvum* y *C. ubiquitum* demostradas microscópica y molecularmente. (López *et al.*, 2009; Gomez-Couso *et al.*, 2012). Los trabajos realizados previamente en criptosporidiosis en alpacas en Perú están basados principalmente en el diagnóstico microscópico, lo cual dificulta conocer cuál es la especie involucrada en la infección. Estos estudios corresponden a hallazgos epidemiológicos de prevalencia realizados en su totalidad en crías de alpaca, los cuales evidencian prevalencias que oscilan entre 10 % a 25 % (Rojas 1988; García 1995; Fernández 1995; Villacorta *et al.*, 2009; López *et al.*, 2009; Gómez-Couso *et al.*, 2012). Por otro lado, las prevalencias encontradas fuera de Sudamérica son más bajas. Prevalencias de 6.7 % y 25.9 fueron encontradas en crías de llamas y alpacas de Estados Unidos respectivamente (Cebra *et al.*, 2003; Whitehead y Anderson, 2006). Además, una prevalencia de 8.8 % fue reportada en Inglaterra y en Gales (Twomey *et al.*, 2008). Las prevalencias encontradas en estos países desarrollados son menores comparados con los hallados en nuestro país debido a su baja población de alpacas, altos niveles sanitarios y manejo adecuado del ganado

La importancia de este trabajo que tiene como fin conocer mejor la epidemiología de *Cryptosporidium* se debe al carácter zoonótico de *C. parvum* y en algunos casos de *C. andersoni* y otras especies como *C. meleagridis*. Los últimos estudios de epidemiología molecular indican que *C. meleagridis* es el responsable de más infecciones humanas de las que se pensaba. Por ejemplo, las tasas de infección con *C. meleagridis* son más altas que las de *C. parvum* en países como Perú (Cama *et al.*, 2008 Xiao, 2010). Además, *C. andersoni* (Kvác *et al.*, 2004; Morse *et al.*, 2007) y *C. bovis* pueden causar infecciones zoonóticas bajo ciertas circunstancias (Khan *et al.*, 2010), sobre todo cuando los cambios ambientales y socioeconómicos favorecen la transmisión (Xiao *et al.*, 2004). Por otro lado, en Irán se encontraron humanos padeciendo de criptosporidiosis por estar en contacto directo con los camellos (Sazmand *et al.*, 2012).



La totalidad de los estudios epidemiológicos de criptosporidiosis en alpacas a nivel mundial se han hecho en crías y en madres pero no en machos reproductores. Este hecho tal vez se deba a que los machos reproductores, al igual que las madres y cualquier animal adulto con un sistema inmune intacto, puede no tener diarrea a pesar de estar eliminando ooquistes de *Cryptosporidium*. En consecuencia, no se conoce la especie de *Cryptosporidium* que afecta a los machos reproductores, si esta puede producir diarrea en ellos, ni si afecta la producción de fibra y carne. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue determinar la prevalencia de la criptosporidiosis en machos reproductores para comprender mejor la epidemiología de la enfermedad.

El presente estudio es el primero realizado en alpacas machos adultos en el mundo. Los estudios de criptosporidiosis en alpacas adultos son muy escasos ya que no se han realizado en Sudamérica, sin embargo, Rulofson *et al.*, (2001) y Burton *et al.*, (2012) realizaron estudios en CSA hembras adultas en California, donde la prevalencia de *Cryptosporidium* en las últimas décadas fue casi nula. Los resultados fueron distintos ya que Rulofson *et al.*, (2001) encontró una prevalencia de 0% pero Burton *et al.*, (2012) encontró una prevalencia de 9% a *Cryptosporidium parvum* (IC 95% 4-19%). La prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en nuestro estudio (56%) es mayor comparada con la de estos trabajos por múltiples factores como: menores índices sanitarios y manejo del ganado ineficiente (Puno y Cuzco más del 50% población total de alpacas) (López *et al.*, 2009)

La prevalencia corregida encontrada a *C. parvum*-like en alpacas machos reproductores en el presente estudio fue de 18.5 %. Esta prevalencia es relativamente alta comparada con las prevalencias encontradas a *C. parvum* en ganado adulto ya que está ampliamente documentado que este parásito predomina principalmente en animales no destetados, es decir en animales de 0 – 3 meses, y *C. andersoni* está presente en su mayoría en animales jóvenes y adultos. (Santín *et al.*, 2004, Kvác *et al.*, 2006, Fayer *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2011b y Liu *et al.*, 2009). Prevalencias a *C. parvum* de 6% en vaquillas de 1-2 años (Santín *et al.*, 2004) de 6% en vacas lecheras (Fayer *et al.*, 2006) y 1.1% en ganado cárnico (Hoar *et al.*, 2001) fueron reportadas en Estados Unidos y de 0% en ganado lechero de 1 año de edad en República Checa. (Kvac *et al.*, 2007).

La alta prevalencia a *C. parvum* encontrada en nuestro estudio comparada con estudios realizados previamente en otros países se podría deber al contacto directo que tienen las alpacas machos reproductores de nuestro estudio con las crías, favoreciendo así la infección (Starkey *et al.*

2006). En efecto, el muestreo se realizó en la época de empadre y de parición (Enero - Marzo) donde los machos reproductores son llevados al corral de las hembras, quienes están acompañadas por sus crías, pudiendo ser contaminados por las crías y hembras durante el tiempo que dure el empadre por estar en contacto directo. Por otro lado, la reducción de las defensas a causa del estrés producido por las riñas entre machos favorecen la criptosporidiosis (Wilson y Franklin 1984; Jarman y Jarman 1974).

No se puede descartar el papel del ser humano como fuente de *C. parvum* para las alpacas machos y viceversa. Starkey *et al.* (2007) reportaron el primer caso de *Cryptosporidium* atribuido a la alpaca, donde alpacas parasitadas de forma subclínica pudieron infectar al ser humano y viceversa. Efectivamente, al realizar la recolección de heces se pudo observar que los corrales de crianza carecían de letrinas para los humanos y además, los criadores de alpacas estuvieron acompañados por sus hijos en los meses del muestreo (Enero y Febrero) por ser época de vacaciones escolares. En consecuencia, los lugares donde pastaban y permanecían las alpacas podrían estar contaminados con heces de humanos y de los mismos camélidos siendo un riesgo de infección tanto para humanos como para animales tal como sugieren Fayer y Xiao (2007).

La prevalencia corregida de *C. andersoni* en alpacas machos reproductores de este estudio fue de 53.1%. Esta alta prevalencia podría guardar relación con las encontradas previamente en ganado vacuno adulto, ya que la especie que predomina en ganado adulto es *C. andersoni*, encontrándose prevalencias de 0% a 75.4 % en China (Liu *et al.*, 2009), 17.8% en República Checa (Kvác *et al.*, 2006). Adicionalmente, las prevalencias de *C. andersoni* halladas por Fayer *et al.*, 2007 de 44% en vaquillas y de 65% en vacas lecheras soportan la prevalencia hallada en nuestro estudio. La alta prevalencia de este estudio se debería, así como en el ganado vacuno, a que la enfermedad es dependiente de la edad del hospedador, es decir guarda relación con la edad (Santín *et al.*, 2004; Fayer 2006, 2007; Olson *et al.*, 2004).

Al parecer la especie predominante en las crías de alpaca sería *C. parvum*, tal como se ha reportado en múltiples estudios previos en nuestro país (Rojas 1988; García 1995; Fernández 1995; Villacorta *et al.*, 2009; López *et al.*, 2009; Gómez-Couso *et al.*, 2012). Por otro lado, la especie que predominaría en alpacas adultos sería *C. andersoni*. La razón por la cual los estudios en ganado macho adultos son limitados podría deberse al tipo de crianza de los hospederos. Debido a que son sistemas tecnificados (inseminación) la presencia de ganado macho es casi nula en los establos

lechero. Por otro lado, la explotación alpaquera tiene como fin la producción de fibra en la cual el sexo del animal es irrelevante en esta producción.

A pesar que *C. andersoni* ha sido reportado en camellos adultos del viejo mundo (*Camelus bactrianus*) (Wang *et al.*, 2008), en alpacas se le ha observado, pero este hallazgo no está reportado oficialmente (Perales, comunicación personal). La infección de las alpacas machos reproductores podría deberse al contacto con ganado vacuno. En efecto, alpacas machos muestreados en este estudio estaban en contacto y pastaban los mismos campos con vacas de la zona, pudiendo actuar como una fuente de *C. andersoni* para la población de alpacas estudiadas (Ramírez *et al.*, 2004; Pena *et al.*, 1997; Wade *et al.*, 2000).

Las altas prevalencias, tanto de *C. parvum-like* (18.5%) como de *C. andersoni* (53.1%), encontradas en este estudio se deberían a otros factores que no se han expuesto anteriormente. Los factores ambientales, como las temporadas de lluvias (Hansen y Ongerth, 1991; Li *et al.*, 2005) y el factor manejo, como la crianza mixta, el tipo de explotación, el hacinamiento y disponibilidad de pasturas, son factores importantes en la presentación de *Cryptosporidium* spp. en alpacas. El muestreo para este trabajo se realizó entre Enero y Febrero, meses donde hay mayor precipitación en la sierra peruana. En consecuencia, la concentración de ooquistes en aguas de río es más alta en temporada de lluvias (Hansen y Ongerth, 1991), las cuales serían utilizadas como fuente de agua para los animales (Li *et al.*, 2005).

La explotación alpaquera peruana desarrolla una crianza semi-extensiva ya que estos animales pastan en los campos durante el día y solo están en corrales en la noche. Adicionalmente, las alpacas machos vuelven a estar hacinados al momento del empadre por lo que es probable encontrar bajas prevalencias de *Cryptosporidium* spp. durante el año, tal como demostraron Kvác *et al.*, (2006), donde el ganado cárnico, que tenía una crianza extensiva, presentó una menor prevalencia de *Cryptosporidium* y menos riesgo de infección comparado con el ganado lechero que tiene una crianza intensiva. Otro factor de importancia es la crianza mixta. Las alpacas muestreadas compartían los corrales con ovejas y en algunas zonas de pastura con vacas. Estas especies pueden actuar como fuentes de infección para las alpacas (Causape *et al.*, 2002; Bomfim *et al.* 2005; Shen *et al.*, 2011). Finalmente, el hacinamiento evidenciado al momento del empadre producirá una mayor carga parasitaria en el dormitorio de las madres y crías y estrés por la competencia entre machos ocasionando un hipofuncionamiento del sistema inmune, con lo que el organismo queda expuesto a

la acción de los agentes infecciosos del ambiente, es más susceptible a padecer enfermedades como la criptosporidiosis (Glaser *et al.*, 2005).

## VI. CONCLUSIONES

*Cryptosporidium andersoni* y *Cryptosporidium parvum-like* son los agentes que parasitan a las alpacas machos reproductores

La prevalencias encontradas de *Cryptosporidium spp.* en alpacas machos reproductores fueron 53.1% para *C. andersoni* y 18.5% para *C. parvum-like*, por lo que pueden considerar altas comparadas con las encontradas en otros estudios en camélidos sudamericanos

## **VII. RECOMENDACIONES**

Realizar estudios epidemiológicos en otras especies animales (ovinos y bovinos) que se crían junto a los rebaños de alpacas

Realizar estudios epidemiológicos en alpacas de otros estratos etarios de la explotación alpaquera como en crías de un mes, animales al destete, hembras al empadre y sus crías, hembras al momento del parto, machos jóvenes y viejos, entre otros.

### VIII. LITERATURA CITADA

1. **Abrahamsen M.S, Lancto CA, Walcheck B, Layton W, Jutila MA. 1997.** Localization of alpha/beta and gamma/delta T lymphocytes in *Cryptosporidium parvum*-infected tissues in naive and immune calves. *Infect. Immun.* 65, 2428–2433
2. **Ahlbom, 1990.** Introduction to Modern Epidemiology. Chesnut Hill: Epidemiology Resources INC, 102pp.
3. **Alonso-Fresán MU, García-Alvarez A, Salazar-García F, Vázquez-Chagoyán JC, Pescador-Salas N, Saltijeral-Oaxaca J.2005.** Prevalence of *Cryptosporidium* in asymptomatic sheep in family flocks from Mexico State. *J Vet Med* 52: 482-483.
4. **Alves M, Xiao L, Antunes F, Matos O. 2006.** Distribution of *Cryptosporidium* subtypes in humans and domestic and wild ruminants in Portugal. *Parasitol Res* 99: 287–292.
5. **Araki S, Martin-Gomez S, Becares E, Luis-Calabuig E, Rojo-Vasquez F. 2001.**Effect of high-rate algal ponds on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol*67: 3322-3324.
6. **Atwill ER, Hou L, Karle BM, Hater T, Tate KW, Dahlgren RA. 2002.** Transport of *Cryptosporidium parvum* oocysts through buffer strips and estimated filtration efficiency. *Appl Environ Microbiol* 68: 5517-5527.

7. **Becher KA, Robertson ID, Fraser DM, Palmer DG, Thompson RC. 2004.** Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dairy calves originating from three sources in Western Australia. *Vet Parasitol* 123:1-9.
  
8. **Bern C, Ortega Y, Checkley W, Roberts JM, Lescano AG, Cabrera L. 2002.** Epidemiologic differences between cyclosporiasis and cryptosporidiosis in Peruvian children. *Emerg Infect Dis* 8:581-583.
  
9. **Betancourt WQ, Rose JB. 2005.** Microbiological assessment of ambient waters and proposed water sources for restoration of a Florida wetland. *J Wat Hith* 32: 89-100.
  
10. **Bomfim TC, Huber F, Gomes RS, 2005.** Natural infection by *Giardia* sp. and *Cryptosporidium* sp. in dairy goats, associated with possible risk factors of the studied properties. *Vet Parasitol* 134: 9-13.
  
11. **Bridgman SA, Robertson RM, Syed Q, Speed N, Andrews N, Hunter PR. 1995.** Outbreak of *Cryptosporidium* associated with a disinfected groundwater supply. *Epidemiol Infect* 115: 555-566.
  
12. **Budu-Amoako E, Greenwood SJ, Dixon BR, Barkema HW, McClure JT. 2011.** Foodborne illness associated with *Cryptosporidium* and *Giardia* from livestock. *Jourl of Food Protec* 11:1944-1955.
  
13. **Budu-Amoako E, Greenwood SJ, Dixon BR, Barkema HW, McClure JT. 2012.** *Giardia* and *Cryptosporidium* on Dairy Farms and the Role these Farms May Play in Contaminating Water Sources in Prince Edward Island, Canada. *J Vet Intern Med* 26:668-673.
  
14. **Burton AJ, Nydam DV, Mitchell KJ, Bowman DD. 2012.** Fecal shedding of *Cryptosporidium* oocysts in healthy alpaca crias and their dams. *J Am Vet Med Assoc* 241: 496-498.
  
15. **Bustinza V. 2001.** La alpaca: conocimiento de gran potencial andino. Puno: Oficina de recursos del aprendizaje, Universidad del Altiplano. 495p.



16. **Cama V, Bern C, Roberts J, Cabrera L, Sterling C, Ortega Y, Gilman R, Xiao L. 2008.** *Cryptosporidium* Species and Subtypes and clinical manifestations in children, Peru Emerg Infect Dis 14: 1567–1574.
17. **Cacciò SM, Thompson RC, McLauchlin J, Smith HV. 2005.** Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. Trends Parasitol 21: 430–437.
18. **Capitanio JP, Mendoza SP, Lerche NW, Mason WA. 1998.** Social stress results in altered glucocorticoid regulation and shorter survival in simian acquired immune deficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci* 95: 4714-9.
19. **Carey CM, Lee H, Trevors JT, 2004.** Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. Water Research 38, 818-862.
20. **Castro-Hermida JA, Delafosse A, Pors I, Ares-Mazás E, Chartier C. 2005.** *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium parvum* infections in adult goats and their implications for neonatal kids. Vet Rec 157: 623-627.
21. **Castro-Hermida JA, González-Losada YA, Ares-Mazás E. 2002a.** Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). Vet. Parasitol. 106, 1-10.
22. **Castro-Hermida JA, Gonzalez-Losada YA, Mezo-Menendez M, Ares- Mazas E. 2002b.** A study of cryptosporidiosis in a cohort of neonatal calves. Vet Parasitol 106:11-17
23. **Castro-Hermida JA, Pors I, Méndez-Hermida F, Ares-Mazas E, Chartier C. 2006.** Evaluation of two commercial disinfectants on the viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. Vet J 171. 340-345.
24. **Castro-Hermida JA, Pors I, Otero-Espinar F, Luzardo-Alvarez A. 2004.** Efficacy of alfa-cyclodextrin against experimental cryptosporidiosis in neonatal goats. Vet Parasitol. 120: 35–41

25. **Causape AC, Quilez J, Sanchez-Acedo C, 2002.** Prevalence and analysis of potential risk factors for *Cryptosporidium parvum* infection in lambs in Zaragoza (northeastern Spain). Vet Parasitol 104: 287-298.
26. **Cebra CK, Mattson DE, Baker RJ, Sonn RJ, Dearing PL. 2003.** Potential pathogens in feces from unweaned llamas and alpacas with diarrhea. J Am Vet Med Assoc 223: 1806–1808.
27. **Cebra CK, Valentine BA, Schlipf JW. 2007.** *Eimeria macusaniensis* infection in 15 llamas and 34 alpacas. J Am Vet Med Assoc 230: 94-100.
28. **Chalmers RM, Elwin K, Thomas AL, Guy EC, Mason B. 2009.** Long-term *Cryptosporidium* typing reveals the etiology and species specific epidemiology of human cryptosporidiosis in England and Wales, 2000 to 2003. Euro Surveill. 14: 19086.
29. **Chen W, Harp JA, Harmsen AG. 1993.** Requirement for CD4+ cells and gamma interferon in resolution of established *Cryptosporidium parvum* infection in mice. Infect. Immun. 61:3928–3932.
30. **Chen XM, LaRusso NF. 2000.** Mechanisms of attachment and internalization of *Cryptosporidium parvum* to biliary and intestinal epithelial cells. Gastroenterology 118: 367-379.
31. **Chen XM, Levine SA, Splinter PL, Tietz PS, Ganong AL, Jobin C, Gores GJ, Paya CV, LaRusso NF. 2001.** *Cryptosporidium parvum* activates nuclear factor kappa B in biliary epithelia preventing epithelial cell apoptosis. Gastroenterology 120: 1774 -1783.
32. **Clark D P. 1999.** New insights into human cryptosporidiosis. Clin Microbiol Rev 12:554–563.
33. **Clark DP, Sears CL. 1996.** The pathogenesis of cryptosporidiosis. Parasitol Today 12: 221- 225.
34. **Current, WL, Resse NC, 1986.** A comparison of endogenous development of the three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. J Protozool. 33: 98-108.

35. **de Graaf DC, Vanopdenbosch E, Ortega-Mora LM, Abbassi H, Peeters JE. 1999.** A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int J Parasitol Rev* 20: 1269-1287.
36. **Deng M, Lancto CA, Abrahamsen MS. 2004.** *Cryptosporidium parvum* regulation of human epithelial cell gene expression. *Int J Parasitol* 34: 73-82.
37. **Díaz A. 2002.** Cryptosporidiosis en el Ganado bovino. XI Congreso Venezolano de Produccion e Industria Animal. Conferencia ULA-Trujillo.
38. **Diaz A, Ramirez L, Godoy R, Roman R. 2002.** Excrecion de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. durante el postparto, en vacas mestizas de doble propósito. *Rev Cientifica XII suplemen 2*: 614-616.
39. **Dixon BR. 2009.** The role of livestock in the foodborne transmission of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. to humans, CAB International, Wallingford, UK p. 107–122.
40. **Duggan C, Gannon J, Walker WA. 2002.** Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 75, 789–808.
41. **Elwin K, Chalmers RM. 2008.** Contemporary identification of previously reported novel *Cryptosporidium* isolates reveals *Cryptosporidium bovis* and the cervine genotype in sheep (*Ovis aries*). *Parasitol Res* 102: 1103-1105.
42. **Enemark HL, Ahrens P, Lowry CJ, Thamsborg SM, Enemark JMD, Bille-Hansen V, Lind P. 2002.** *Cryptosporidium andersoni* from a Danish cattle herd: Identification and preliminary characterization. *Vet Parasitol* 107: 37–49.
43. **Esteban JG, Aguirre C, Flores A, Strauss W, Angles R, Mas-Coma S. 1998.** High *Cryptosporidium* prevalences in healthy Aymara children from the northern Bolivian Altiplano. *Am J Trop Med Hyg* 58: 50–55.

44. **Esteban E, Anderson BC. 1995.** *Cryptosporidium muris*: prevalence, persistency, and detrimental effect on milk production in a drylot dairy. J Dairy Sci 78:1068–72.
45. **[FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2005.** Situación actual de camélidos sudamericanos en Perú. Proyecto de cooperación técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los camélidos sudamericanos en la región andina. Lima: FAO 63 p.
46. **[FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2006.** The politics of livestock sector policy and the rural poor en Peru. The pro-poor livestock policy initiative. California FAO 31p.
47. **Faubert GM, Litvinsky Y. 2000.** Natural transmission of *Cryptosporidium parvum* between dams and calves on a dairy farm. J Parasitol 86:495-500.
48. **Fayer R. 1994.** Effect of high temperatures on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocyst in water. Appl Envirom Microbiol 60: 2732-2735.
49. **Fayer R. 2004.** *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. Vet Parasitol 126: 37-56
50. **Fayer R. 2010.** Taxonomic considerations regarding the species and genotypes of *Cryptosporidium*. Exp Parasitol 124: 90–97.
51. **Fayer R, Andrews C, Ungar BL, Blagburn B. 1989.** Efficacy of hyperimmune bovine colostrum for prophylaxis of cryptosporidiosis in neonatal calves. J Parasitol 75: 393-397.
52. **FayerR, Nerad T. 1996.** Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. Appl Enviro Microbiol 62: 1431-1433.
53. **Fayer R, Morgan U, Upton S. 2000.** Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. Int J Parasitol 30: 1305 – 1322.

54.       **Fayer R, Santin M. 2009.** *Cryptosporidium xiaoi* sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). Vet Parasitol 164: 192- 200.
  
55.       **Fayer R, Santin M, Trout JM. 2008.** *Cryptosporidium ryanae* sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*) Vet Parasitol 156: 191–198.
  
56.       **Fayer R, Santin M, Macarisin D. 2010.** *Cryptosporidium ubiquitum* sp. Animals and humans. Vet Parasitol 172: 23–32.
  
57.       **Fayer, R, Santin, M, Trout JM, Greiner E. 2006.** Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1 – to 2- years-old dairy cattle in eastern United States. *Vet. Parasitol.* 135: 105-112.
  
58.       **Fayer R, Santin M, Trout JM. 2007.** Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations. Vet Parasitol 145: 260-266.
  
59.       **Fayer R, Speer CA, Dubey JP. 1997.** The general biology of *Cryptosporidium*; *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. CRC press Boca Raton. 47pp.
  
60.       **Fayer R, Trout JM, Jenkins MC. 1998.** Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocyst stored in water at environmental temperatures. J Parasitol 84: 1165-1169.
  
61.       **Fayer R, Trout JM, Graczyk TK, Lewis EJ. 2000.** Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Eimeria* infections in postweaned and adult cattle on three Maryland farms. Vet. Parasitol. 93, 103-112.
  
62.       **Fayer R, Trout JM, Walsh E, Cole R. 2000b.** Rotifers ingest oocysts of *Cryptosporidium parvum*. J Eukaryot Microbiol 47: 161-163.
  
63.       **Fayer R, Xiao L. 2007.** *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis Second Edition, Estados Unidos ; Taylor & Francis Group, LLC: 70- 330 pp

64. **Feng Y, Ortega Y, He G, Das P, Xu M, Zhang X, Fayer R, Gatei W, Cama V, Xiao L. 2007.** Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Vet Parasitol* 144:1-9.
65. **Fernández M. 1995.** Prevalencia de *Cryptosporidium parvum* en alpacas neonatales del Centro Experimental La Raya, Cuzco. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ Nac Mayor de San Marcos. 30-40 pp.
66. **Flanigan T, Whalen C, Turner J, Soave R, Toerner J, Havlir D. 1992.** *Cryptosporidium* infection and CD4 counts. *Ann Intern Med* 116: 840-842.
67. **Fleta J, Sanchez-Acedo C, Clavel A, Quilez J. 1995.** Detection of *Cryptosporidium* oocysts in extraintestinal tissues of sheep and pigs. *Vet Parasitol* 59: 201-205
68. **Foster JC, Glass MD, Courtney PD, Ward LA. 2003.** Effect of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Food Microbiology* 20: 351-357
69. **Garber LP, Salman MD, Hurd HS, Keefe T, Schlater JL. 1994.** Potential risk factors for *Cryptosporidium* infection in dairy calves. *JAVMA* 205:86-91.
70. **García M. 1995.** Prevalencia de *Cryptosporidium parvum* en alpacas neonatales del Centro Experimental La Raya, Cuzco. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 30-40 pp.
71. **Garcia AM, Lima JD. 1993.** Frequencia de *Cryptosporidium* en becerros lactantes de rebanho leiteiro de Minas Gerais. *Arquivo Bras Med Vet Zoot* 45: 193-198.
72. **Geurden T, Goma FY, Siwila J, Phiri IG, Mwanza AM, Gabriel S, Claerebout E, Vercruysse J. 2006.** Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* in three cattle husbandry systems in Zambia. *Vet Parasitol* 138:217-222

73. **Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. 2005.** Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nature Rev Immunol*; 5: 243-51.
74. **Gómez-Couso H, Ortega-Mora L, Aguado-Martínez A, Rosadio-Alcántara R, Maturrano-Hernández L, Luna-Espinoza L, Zanabria-Huisa V, Pedraza-Díaz S. 2012.** Presence and molecular characterization of *Giardia* and *Cryptosporidium* in alpacas (*Vicugna pacos*) from Peru. *Vet Parasitol* 187: 414– 420.
75. **Gómez-González B, Escobar A. 2002.** Neuroanatomía del estrés. *Rev Mex Neuroci* 3: 273-82.
76. **Goodgame RW, Kimball K, Ou CN, White AC, Genta RM, Lifschitz CH, Chappell CL. 1995.** Intestinal function and injury in acquired immunodeficiency syndrome-related cryptosporidiosis. *Gastroenterology* 108: 1075-1082.
77. **Hamnes IS, Gjerde B, Robertson L .2006.** Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in three areas of Norway. *Vet Parasitol* 140:204-216.
78. **Hansen JS, Ongerth JE.1991.** Effects of time and watershed characteristics on the concentration of *Cryptosporidium* oocysts in river water. *Appl Environ Microbiol* 57: 2790-2795
79. **Harp JA, Goff JP. 1998.** Strategies for the Control of *Cryptosporidium parvum* Infection in Calves. *J Dairy Sci* 81:289–295
80. **Henricksen SA, Pohlenz JF.1981.** Staining of *Cryptosporidium* by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet Scand* 22:594-596.
81. **Hoar BR, Atwill ER, Elmi C, Farver TB. 2001.** An examination of risk factors associated with beef cattleshedding pathogens of potential zoonotic concern. *Epidemiol. Infect* 127: 147 – 155.
82. **Holland RE. 1990.** Some infectious causes of diarrhea in Young farm animal. *Clin Microbiol Rev* 10: 345-375

83. **Horman A, Korpela H, Sutinen J, Wedel H, Hanninen ML. 2004.** Meta-analysis in assessment of the prevalence and annual incidence of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. infections in humans in the Nordic countries. *Int J Parasitol* 34:1337–1346.
84. **Huang BQ, Chen XM, LaRusso NF. 2004.** *Cryptosporidium parvum* attachment to and internalization by human biliary epithelia in vitro, a morphological study. *J Parasitol* 90: 212-221.
85. **Huetink RE, van der Giessen JW, Noordhuizen JP, Ploeger HW. 2001.** Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. *Vet Parasitol* 102:53–67
86. **Hunter PR, Nichols G. 2002.** Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol Rev* 15: 145–154.
87. **Jarman PJ, Jarman MV. 1974.** Impala behaviour and its relevance to management. *Publ. New Ser.* 24, 871-881
88. **Jellison KL, Hemond HF, Schauer DB. 2002.** Sources and species of *Cryptosporidium* oocysts in the Wachusett reservoir watershed. *Appl Environ Microbiol* 68:569–575.
89. **Jenkins MC. 2004.** Present and future control of cryptosporidiosis in humans y animals. *Exp Rev Vacc* 3: 669-671.
90. **Jenkins MC, Trout MJ, Higgins J, Dorsch M, Veal DM, Fayer R. 2003.** Comparison of tests for viable and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Parasitol Res* 89: 1-5.
91. **Kay G, Tarcic N, Poltyrev T, Weinstock M. 1998.** Prenatal stress depresses immune function in rats. *Physiol Behav*; 63: 397-402.
92. **Kehl KS, Cicirello CH, Havens PL. 1995.** Comparison of four different methods for the detection of *Cryptosporidium* species. *J Clin Microbiol* 33:416–418.



93. **Keller SE, Weiss JM, Schleifer SJ, Miller NE, Stein M. 1981.** Suppression of immunity by stress: effects of a graded series of stressors on lymphocyte stimulation in the rat. *Science*; 213: 1397-400.
94. **Khan SM, Debnath C, Pramanik AK, Xiao L, Nozaki Y, Ganguly S. 2010.** Molecular characterization and assessment of zoonotic transmission of *Cryptosporidium* from dairy cattle in West Bengal, India. *Vet Parasitol* 171:41–7.
95. **King BJ, Keegan AR, Monis PT, Saint CP. 2005.** Experimental temperature controls *Cryptosporidium* oocysts metabolic rate and associated retention of infectivity. *Appl Environ Microbiol* 71: 3848-3857.
96. **King BJ, Monis PT. 2007.** Critical processes affecting *Cryptosporidium* oocyst survival in the environment. *Parasitol Vet* 134: 309-323.
97. **Kistemann T, Classen T, Koch C. 2002.** Microbial load of drinking water reservoir tributaries during extreme rainfall and runoff. *Appl Environ Microbiol* 68:2188–2197.
98. **Kvác M, Ditrich M, Sak B, Kvetonová D, Ditrich O, Hofmannová J, Modrý D, Vítovec J. 2008.** Infectivity, pathogenicity, and genetic characteristics of mammalian gastric *Cryptosporidium* spp. In domestic ruminants. *J Parasitol* 153: 363-367.
99. **Kvác M, Ditrich O, Kouba M, Sak B, Vítovec J, Kvetonová D. 2004.** Failed attempt of *Cryptosporidium andersoni* infection in lambs. *Folia Parasitol.* 51: 373–374.
100. **Kvác M, Kvetonová D, Púzova G, Ditrich O. 2002.** Comparison of selected diagnostic methods for identification of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium andersoni* in routine examination of feces. *J Vet Med* 50: 405 – 411.
101. **Kvác M, Kouba B, Vítovec J. 2006.** Age-related and housing-dependence of *Cryptosporidium* infection of calves from dairy and beef herds in South Bohemia, Czech Republic. *J Parasitol* 137: 202-209.

102.      **Kvác M, Vítovec J.2003.** Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. J Vet Med B 5: 451–457.
103.      **Lacroix S, Mancassola R, Naciri M, Laurent F. 2001.** *Cryptosporidium parvum*-specific mucosal immune response in C57BL/6 neonatal and gamma interferon-deficient mice: role of tumor necrosis factor alpha in protection. Infect. Immun. 69, 1635–1642.
104.      **Langer RC, Riggs MW. 1999.** *Cryptosporidium parvum* apical complex glycoprotein CSL contains a sporozoite ligand for intestinal epithelial cell. Infect Immun 67: 5282-5291.
105.      **Lake IR, Bentham G, Kovats RS, Nichols GL.2005.** Effects of weather and river flow on cryptosporidiosis. J Wat Health 3: 469-474.
106.      **Learmonth JJ, Ionas G, Ebbett KA, Kwan ES. 2004.** Genetic characterization and transmission cycles of *Cryptosporidium* species isolated from humans in New Zealand Appl Environ Microbiol70: 3973–3978.
107.      **Leoni F, Amar C, Nichols G, Pedraza-Diaz S, McLauchlin J. 2006.** Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhea in England between 1985 and 2000. J Med Microbiol 55: 703-707.
108.      **Li X, Atwill ER, Dunbar LA, Jones T, Hook J, Tate KW. 2005.** Seasonal temperature fluctuations induce rapid inactivation of *Cryptosporidium parvum*. Environ SciTechnol 39: 4484-4489.
109.      **Liu A, Wang R, Li Y, Zhang L, Shu J, Zhang W, Feng Y, Xiao L, Ling H. 2009.** Prevalence and distribution of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Heilongjiang Province, China. Parasitol Res 105:797–802.
110.      **López-Urbina MT. 1997.** Estudio epidemiológico de la infección por *Cryptosporidium parvum* en alpacas neonatas en Perú. Tesis doctoral, Universidad de León, León 177pp.

111. **López T, González A, Vázquez F. 2001.** Infección experimental de alpacas neonatas de alpacas con *Cryptosporidium parvum*. Rev Acad Per Cienc Vet 2: 11-17.
112. **López-Urbina MT, González AE, Gomez-Puerta LA, Romero-Arbizu MA, Rojo-Vázquez FA, Xiao L, Cama V. 2009.** Prevalence of Neonatal Cryptosporidiosis in Andean Alpacas (*Vicugna pacos*) in Perú. Parasitol Jorl 3:9-13.
113. **Mahdi NK, Ali NH. 2002.** Cryptosporidiosis among animal handlers and their livestock in Basrah, Iraq. East Afr Med J 79: 550-553.
114. **Maldonado-Camargo S, Atwill ER, Saltijeral-Oaxaca JA, Herrera-Alonso LC. 1998.** Prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium parvum* in Holstein Freisian dairy calves in central Mexico. Prev Vet Med 36: 95- 107.
115. **Mann ED, Selda LH, Nayar GPS, Koschik C. 1986.** Infection with *Cryptosporidium* spp. In humans and cattle in Manitoba. Can J Vet Res 50: 174-178.
116. **Martín-Gómez S, Alvarez-SánchezMA, Rojo-VázquezFA. 2005.** Oral administration of hyperimmune anti-*Cryptosporidium parvum* ovine calostrual that confers a high level of protection against cryptosporidiosis in newborn NMRI mice. J Parasitol 91:674–678.
117. **MacDonald TT, Spencer J. 1992.** Cell-mediated immune injury in the intestine. Gastroenterol. Clin. North Am. 21, 367–386.
118. **Medema G, Taunis P, Blokker M, Deere D, Davison A, Charles P, Loret JF. 2006.** WHO Guidelines for drinking water quality: *Cryptosporidium* New York: WHO 138p.
119. **Miron D, Kenes J, Dagan R. 1991.** Calves as a source of an outbreak of cryptosporidiosis among young children in an agricultural closed community. Pediatr Infect Dis J 10:438–441.
120. **Mohammed HO, Wade SE, Schaaf S. 1999.** Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in dairy cattle in southeastern New York State. Vet Parasitol 83: 1-13.

121. **Monis PT, Thompson RCA.2003.** *Cryptosporidium* and *Giardia* zoonosis: fact or fiction. Infect Genet Evol 3: 233–244.
122. **Monjan A, Collector MI. 1977.** Stress-induced modulation of the immune response. Science; 196: 307-8.
123. **Morgan UM, Pallant I, Dwyer BW, Forbes DA, Rich G, Thompson RCA. 1998a.** Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in Human Fecal Specimens. Clinical Journ Clinic Microbiol 4: 995 – 998.
124. **Morgan UM, Sargent KD, Desplazes P, Forbes DA, Spano F, Hertzbergm H, Elliot A, Thompson RCA. 1998b.** Molecular Characterization of *Cryptosporidium* from various hosts. Vet Parasitology 117: 31- 37.
125. **Morgan UM, Xiao L, Monis P, Sulaiman I, Pavlasek I, Blagburn B, Olson M, Upton SJ, Khramtsov NV, Lal A, Elliot A, Thompson RC 2000.** Molecular and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium muris* from various hosts. Parasitol 120:457–464
126. **Morse TD, Nichols RA, Grimason AM, Campbell BM, Tembo KC, Smith HV. 2007.** Incidence of cryptosporidiosis species in pediatric patients in Malawi. Epidemiol Infect; 135:1307–15.
127. **Mtambo MM, Nash AS, Blewett DA, Wright S. 1992.** Comparison of staining and concentration techniques for detection of *Cryptosporidium* oocyst in cat fecal specimens. Vet Parasitol 45: 49-57.
128. **Mtambo MM, Sebatwale JB, Kambarage DM, Muhairwa AP, Maeda EG, Kusiluka LJ, Kazwala RR. 1997.** Prevalence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in cattle and wildlife in Morogoro region, Tanzania. Preventive Vet Med 31: 185-190.

129. **Naumova EN, Christodouleas J, Hunter PR, Syed Q. 2005.** Effect of precipitation on seasonal variability in cryptosporidiosis recorded by the North West England surveillance system in 1990–1999. *J Wat Health* 3:185–196.
130. **O’Handley RM, Ceri H, Anette C, Olson ME. 2003.** Passive immunity and serological immune response in dairy calves associated with natural *Giardia duodenalis* infections. *Vet Parasitol* 113:89–98.
131. **O’Hara SP, Huang BQ, Chen XM, Nelson J, LaRusso NF. 2005.** Distribution of *Cryptosporidium parvum* sporozoite apical organelles during attachment to and internalization by cultured biliary epithelial cells. *J Parasitol* 91: 995-999.
132. **Olson ME, O’Handley RO, Ralston BJ, McAllister TA, Thompson RCA. 2004.** Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trends Parasitol* 20:185–191.
133. **Omg C, Moorehead W, Ross A, Isaac-Renton J. 1996.** Study of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in two adjacent watersheds. *Appl Envirom Microbiol* 32: 2798-2805.
134. **Ono K, Hidetaka T, Shiba KR, Akio Y, Kuniyoshi M, Tauro E, Hak H, Takasi K, Shoji U. 2001.** Contamination of river water by *Cryptosporidium parvum* oocysts in Western Japan. *Apple Envirom Microbiol* 67: 3832- 3836.
135. **[ONU] Organización de las Naciones Unidas. 2010.** El futuro de los productos andinos en la región alta y los valles centrales de los andes/textiles – camélidos. Estado de situación del sector textil camélidos en Perú (Diagnostico Nacional). Perú: ONUDI 5-18p.
136. **Palacios CA, Perales RA, Chavera AE, Lopez MT, Braga WU, Moro M. 2006.** *Eimeria macusaniensis* y *Eimeria Ivitaensis* coinfection in fatal cases of diarrhea in young alpacas (*Lama pacos*) in Peru. *Vet Rec* 158: 344- 345.
137. **Paul S, Chandra D, Tewari AK, Banerjee PS, Ray DD, Raina OK, RaoJR. 2009.** Prevalence of *Cryptosporidium andersoni*: a molecular epidemiological survey among cattle in India. *Vet Parasitol* 161:31-35.

138.      **Pavlásek I. 1995.** *Cryptosporidium* in mammals - laboratory methods of detection and diferencial diagnostics. Vet stv 6: 265-271.
139.      **Pena HF, Kasai JN, Gennari SM. 1997.** *Cryptosporidium muris* in dairy cattle in Brazil. Vet Parasitol 73: 353-355.
140.      **Plutzer J, Karanis P. 2009.** Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. Vet Parasitol 165:187-199.
141.      **Preiser G, Preiser L, Madeo L. 2003.** An outbreak of cryptosporidiosis among veterinary science students who work with calves. J Am Coll Health 51: 213-215.
142.      **Priest JW, Bern C, Roberts JM, Kwon JP, Lescano AG, Checkley W. 2005.** Changes in serum immunoglobulin G levels as a marker for *Cryptosporidium* sp. infection in Peruvian children. J Clin Microbiol 43:5298–300.
143.      **Quílez J, Sánchez-Acedo C, Clavel A, del Cacho E, López- Bernad F. 1996.** Comparison of acid-fast-stain and a monoclonal antibody-based immunofluorescence reagent for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal specimens from cattle and pigs. Vet Parasitol 67: 75-81.
144.      **Ramirez NE, Word LA, Sreevatsan S. 2004.** A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. Microbes Infect 6: 773-785.
145.      **Recourt J, Moy G, Vierk K, Schlundt J. 2003.** The present state of foodborns disease in OECD countries. World Health Organization, Genova.
146.      **Robertson LJ, Campbell AT, Smith HV. 1993.** Induction of folds or sutures on the walls of *Cryptosporidium parvum* oocysts and their importance as a diagnostic feature. Appl Environ Microbiol 59: 2638–2641.

147. **Rocha F, Musch MW, Lishanskiy L, Bookstein C, Sugi K, Xie Y, Chang EB. 2001.** IFN-gamma downregulates expression of Na (+)/H (-) exchanges NHE2 and NH4 in rat intestine and human Caco2/bbe cells. *Am J Cell Physiol* 280: 1224-1232.
148. **Rojas M. 2004.** Nosoparasitosis en los rumiantes domésticos peruanos. 2ª ed. Lima: Martegraf. 146 p.
149. **Rojas M, Lobato Y, Montalvo M. 1990.** *Cryptosporidium* en Camélidos sudamericanos, Res XI Cong Panam Cienc Vet, Lima – Perú.
150. **Rosadio RH, Ameghino EF. 1994.** Coccidial infection in neonatal Peruvian alpacas. *Vet Rec* 135: 459- 460.
151. **Rolfe RD. 2000.** The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr* 130: 396S–402S.
152. **Rulofson F, Atwill C, Holmberg C. 2001.** Fecal shedding of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium parvum*, *Salmonella* organisms, and *Escherichia coli* O157:H7 from llamas in California. *AJVR* 4.
153. **Ryan UM, Barh C, Robertson I, Read C, Elliot A, Mcinnes L, Traub R, Besier B. 2005.** Sheep may not be an important zoonotic reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* parasites. *Appl Environ Microbiol* 71: 4992-4997.
154. **Ryan UM, Power M, Xiao L. 2008.** *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from a red kangaroo (*Macropus rufus*). *J Eukaryot Microbiol* 55: 22–26.
155. **Santín M, Trout JM, Fayer R. 2007.** Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland. *Vet Parasitol* 146: 17–24.
156. **Santín M, Trout JM, Fayer R. 2008.** A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Vet Parasitol* 155:15–23.

157.      **Santín M, Trout JM, Xiao L, Zhou L, Greiner E, Fayer R. 2004.** Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. Vet Parasitol 122:103–117.
  
158.      **Sazmand A, Rasooli A, Nouri M, Hamidinejar H, Hekmatimoghaddam S. 2012.** Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in camels and involved people in Yazd province, Iran. Iranian J Parasitol 17: 80-84.
  
159.      **Selye H. 1936.** A syndrome produced by diverse noxious agents. Nature; 138: 32.
  
160.      **Selye H. 1950.** The physiology and pathology of exposure to stress. A treatise based on the concepts of general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. Montreal: Acta Inc.; 23
  
161.      **Shahbazi P, Shayan P, Ebrahimzadeh E, Rahbari S. 2009.** Specific egg yolk antibody against recombinant *Cryptosporidium parvum* p23 protein. Iranian J Parasitol: Vol. 4, No.3 pp. 15-24
  
162.      **Shen Y, Yin J, Yuan ZY, Lu WY, Xu YX, Xiao L, Cao J. 2011.** The Identification of the *Cryptosporidium ubiquitum* in preweaned ovines from Aba Tibetan and Qiang autonomous prefecture in China. Biomed Environ Sci 24: 315-320.
  
163.      **Silverlas C, Emanuelson U, de Verdier K, Bjorkman C. 2009.** Prevalence and associated management factors of *Cryptosporidium* shedding in 50 Swedish dairy herds. Prev Vet Med 90: 242-253
  
164.      **Singh BB, Sharma R, Kumar H, Banga HS, Aulakh RS, Gill JP, Sharma JK. 2006.** Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in Punjab (India) and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. Vet Parasitol 140:162-165.
  
165.      **Slifko TR, Smith V, Ross JD. 2000.** Emerging parasite zoonotic associated with water and food. International Journal for Parasitology 30:1379 – 1393.



166. **Smith HV, Corcoran GD. 2004.** New drugs and treatment for cryptosporidiosis. *Curr Opin Infect Dis* 17: 557-564.
167. **Smith HV, Nichols R, Grimason AM. 2005.** *Cryptosporidium* excystation and invasion: Getting to the guts of the matter. *Trends Parasitol* 21: 133-142.
168. **Spano F, Putignani L, McLauchin J, Casemore DP, Cristanti A. 1997.** PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum* and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS Microbiol Lett* 150: 209-217.
169. **Starkey SR, Johnson AL, Ziegler PE, Mohammed HO. 2007.** An outbreak of cryptosporidiosis among alpaca crías and their human caregivers. *J Am Vet Assoc* 68: 1562-1567.
170. **Starkey SR, Kimber KR, Wade SE. 2006.** Risk factors associated with *Cryptosporidium* infection on dairy farms in a New York State watershed. *J Dairy Sci* 89:4229–4236.
171. **Starkey SR, Wade SE, Schaaf S, Mohammed HO. 2005.** Incidence of *Cryptosporidium parvum* in the dairy cattle population in a New York City Watershed. *Vet Parasitol* 131:197-205.
172. **Stevens TK, Cama V, Wenli Yang, López MT, Gomez L, González AE, Xiao L. 2007.** Unique *Cryptosporidium parvum* infection in alpacas in Perú. *Internacional Giardia and Cryptosporidium Conference*, Morelia, Michoacán, México (May 13-18, 2007) pag. 36
173. **Stott R, May E, Ramirez E, Warren A. 2003.** Predation of *Cryptosporidium* oocysts by protozoa and rotifers, implications for water quality and public health. *Wat Sci Tech* 47: 77-83.
174. **Sugi K, Musch MW, Field M, Chang EB. 2001.** Inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase by interferon gamma down-regulates intestinal epithelial transport and barrier function. *Gastroenterology* 120: 1393-1403.

175. **Surumay Q, Alfaro C. 1999.** *Cryptosporidium* spp. en bovinos jóvenes de fincas lecheras de la región oriental de Venezuela (Resumen): En IV Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias.
176. **Szonyi B, Bordonaro R, Wade SE, Mohammed HO. 2010.** Seasonal variation in the prevalence and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* infection in dairy cattle in the New York City Watershed. *Parasitol Res* 107: 312-325.
177. **Tanriverdi S, Markovics A, Arslan MO, Itik A, Shklap V, Widmer G. 2006.** Emergence of distinct genotypes of *Cryptosporidium parvum* in structured host populations. *Appl Environ Microbiol* 72: 2507–2513.
178. **Thrusfield M. 1990.** Epidemiología veterinaria. P 228-230. Ed. Acribia Zaragoza, España
179. **Trotz-Williams LA, Jarvie BD, Martin SW, Leslie KE, Peregrine AS. 2005.** Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in southwestern Ontario and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. *Can Vet J* 46: 349-351.
180. **Trotz-Williams LA, Martin SW, Leslie KE, Duffield T, Nydam DV, Peregrine AS. 2007.** Calf-level risk factors for neonatal diarrhea and shedding of *Cryptosporidium parvum* in Ontario dairy calves. *Prev Vet Med* 82:12-28.
181. **Twomey DF, Bariow AM, Bell S, Chalmers RM, Eiwin K, Giles M, Higgins RJ, Robinson G, Stringer, RM. 2008.** *Cryptosporidium* in two alpacas holdings in the South-West of England. *Vet J* 175: 419-422.
182. **Tzipori S. 1988.** Cryptosporidiosis in perspective. *Adv. Parasitol.* 27, 63–129.
183. **Tzipori S, Ward H. 2002.** Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes Infect* 4: 1047–1058.

184. **Uga S, Matsuo J, Kono E, Kimura K, Inoue M, Rai SK, Ono K. 2000.** Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection and pattern of oocyst shedding in calves in Japan. Vet Parasitol 94:27-32.
185. **Umemiya R, Fukuda M, Fujisaki K, Matsui T. 2005.** Electron microscopic observation of the invasion process of *Cryptosporidium parvum* in severe combined immunodeficiency mice. J Parasitol 91: 1034-1039.
186. **Villacorta C, López T, González A, Gómez L. 2009.** Evaluación de *Cryptosporidium parvum* como factor de riesgo para la presentación de diarrea neonatal en alpacas en Cuzco. Rev In Vet Perú 20: 277 – 284
187. **Villacorta I, Peeters JE, Vanopdenbosch E, Ares-Mazas E, They H. 1991.** Efficacy of halofuginone lactate against *Cryptosporidium parvum* in calves. Amer Soc Microbiol, p. 283-287.
188. **Whitehead CE, Anderson DE. 2006.** Neonatal diarrhea in llamas and alpacas. Small Ruminant Research 61: 207–215.
189. **Wilson P, Franklin W. 1985.** Male Group Dynamics and Inter-male Aggression of Guanacos in Southern Chile. Tierpsychol., 69,305-328
190. **Wade SE, MohammedHO, Schaaf SL.2000.** Prevalence of *Giardia* sp., *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium muris* (*C. andersoni*) in 109 dairy herds in five counties of south-eastern New York. Vet Parasitol 93: 1-11.
191. **Waitt LH, Cebra CK, Firshman AM, McLenzie EC, Schlipf JW. 2008.** Cryptosporidiosis in 20 alpacas crías. J AM Vet Med Assoc 233: 294 – 298.
192. **Wang R, Wang H, Sun Y, Zhang L, Jian F, Qi M, Ning C, Xiao L. 2011a.** Characteristics of *Cryptosporidium* transmission in preweaned dairy cattle in Henan, China. J Clinic Microbiol 49: 1077–1082.

193.      **Wang R, Ma G, Zhao J, Lu Q, Wang H, Zhang L, Jian F, Ning C, Xiao L. 2011b.** *Cryptosporidium andersoni* is the predominant species in post-weaned and adult dairy cattle in China. *Parasitol Inter* 60: 1-4.
194.      **Wang R, Zhang L, Ning C, Feng Y, Jian F, Xiao L, Lu B, Ai W, Dong H. 2008.** Multilocus phylogenetic analysis of *Cryptosporidium andersoni* (Apicomplexa) isolated from a bactrian camel (*Camelus bactrianus*) in China. *Parasitol Res* 102:915–920.
195.      **Weinstein PM, Macaitis C, Walker, and S. Cameron. 1993.** Cryptosporidial diarrhoea in South Australia an exploratory case-control study of risk factors for transmission. *Med. J. Aust.* 158:117–119.
196.      **Wetzel DMJ, Kuhlenschmidt MS, Dubey JP, Sibey LD. 2005.** Gliding motility leads to active cellular invasion by *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Inf Immun* 73: 5379-5387
197.      **Whitehead CE, Anderson DE. 2006.** Neonatal diarrhea in llamas and alpacas. *Small Ruminant Research* 61: 207–215.
198.      **White C, Robinson P, Okhuysen PC, Lewis DE, Shahab I, Lahoti S, DuPont HL, Chappell CL. 2000.** Interferon-gamma expression in jejunal biopsies in experimental human cryptosporidiosis correlates with prior sensitization and control of oocyst excretion. *J. Infect. Dis.* 181, 701–709.
199.      **Wyatt CR, Brackett EJ, Perryman LE, Rice-Ficht AC, Brown WC, O'Rourke KI. 1997.** Activation of intestinal intraepithelial T lymphocytes in calves infected with *Cryptosporidium parvum*. *Infect Immun* 65:185–190.
200.      **Xiao L. 2010.** Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp Parasitol* 124: 80–89.
201.      **Xiao L, Bern C, Limor J, Sulaiman IM, Roberts J, Checkley W, Cabrera L, Gilman RH, Lal AA. 2001.** Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *J Infect Dis* 183:492–497.

202.        **Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. 2004.** *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advance and Implications for Public Health. Clin Microbial Rev 17:72-97.
203.        **Yamamoto N, Urabe K, Takaoka M, Nakazawa K, Gotoh A, Haga M, Fuchigami H, Kimata I, Iseki M. 2000.** Outbreak of cryptosporidiosis after contamination of the public water supply in Saitama Prefecture, Japan, in 1996. Kansenshogaku Zasshi. 74, 518–526.